

新規抗ヘルペスウイルス剤 amenamevir (ASP2151) の臨床効果予測に関する研究

著者	勝俣 清光
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301乙第9194号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58764

新規抗ヘルペスウイルス剤 amenamevir (ASP2151) の
臨床効果予測に関する研究

2013

勝俣 清光

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、東北大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. Effect of ASP2151, a herpesvirus helicase-primase inhibitor, in a guinea pig model of genital herpes.
Katsumata K, Chono K, Sudo K, Shimizu Y, Kontani T, Suzuki H.
Molecules. 2011;16(9):7210-23
2. Susceptibility of herpes simplex virus isolated from genital herpes lesions to ASP2151, a novel helicase-primase inhibitor.
Katsumata K, Weinberg A, Chono K, Takakura S, Kontani T, Suzuki H.
Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(7):3587-91
3. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ASP2151, a helicase-primase inhibitor, in a murine model of herpes simplex virus infection.
Katsumata K, Chono K, Kato K, Ohtsu Y, Takakura S, Kontani T, Suzuki H.
Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(3):1339-46.

本論文中で使用した略語の一覧

AUC: area under the concentration-time curve

CC₅₀: 50% cytotoxic concentration

C_{max}: peak concentration

EC₅₀: 50% effective concentration

EC₉₀: 90% effective concentration

FBS: fetal bovine serum

HEF: human embryonic fibroblast

HELFL: human embryonic lung fibroblast

HHV: human herpes virus

HIV: human immunodeficiency virus

HSV: herpes simplex virus

IC₅₀: 50% inhibitory concentration

MC: methylcellulose

MIC: minimal inhibitory concentration

PEG: polyethylene glycol

PFU: plaque-forming unit

PHN: post-herpetic neuralgia

PK: pharmacokinetics

PD: pharmacodynamics

QOL: quality of life

T_{>100}: time above 100 ng/mL

T_{>200}: time above 200 ng/mL

VZV: varicella-zoster virus

目次

緒言	1
第一章 ASP2151 の HSV 臨床分離株に対する抗ウイルス活性.....	5
1 序論	5
2 実験結果	6
2.1 ASP2151 に対する本邦および米国臨床分離 HSV の感受性	6
2.2 ASP2151 投与前後での HSV の感受性	10
3 考察	14
第二章 HSV 感染動物モデルにおける ASP2151 の抗ウイルス活性.....	16
1 序論	16
2 実験結果	16
2.1 ASP2151 およびバラシクロビルのモルモット HSV-2 膣感染モデルにおける 効果	16
2.1.1 予防効果	16
2.1.2 治療効果	19
2.1.3 治療効果検討試験における ASP2151 およびバラシクロビルの膣内 HSV-2 ウイルス価減少効果.....	21
2.2 マウス HSV-1 皮膚感染モデルにおける皮膚病変と皮内 HSV-1 ウイルス価の 関係	22
2.3 ASP2151 の皮内 HSV-1 価減少効果	24
3 考察	24
第三章 Pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) 解析による臨床推奨血漿中濃度 の推定.....	27
1 序論	27
2 実験結果	28
2.1 PD 解析	28
2.2 PK 解析	30
2.3 マウス HSV-1 皮膚感染モデルでの Dose-fractionation 法を用いた PK/PD 解析	31

2.4	マウス HSV-1 皮膚感染モデルでの皮下持続投与における PK/PD 解析.....	32
2.5	HSV-1 増殖を完全に抑制する PK/PD パラメータ	35
2.6	バラシクロビルの PK/PD 解析	36
3	考察	37
総括	38
実験材料および実験方法.....		40
謝辞		45
引用文献		46

緒言

ヒトを宿主とするヘルペスウイルス(HHV)は、世界中で多くの感染者を発生させている。現在、HHV には以下の 8 種類が知られており、種々の生物学的特徴より以下の α , β , γ の 3 種に分類されている。

α ヘルペスウイルス亜科	単純ヘルペスウイルス 1 型および 2 型 (HSV-1, HSV-2), 水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV)
β ヘルペスウイルス亜科	サイトメガロウイルス, HHV-6, HHV-7
γ ヘルペスウイルス亜科	Epstein-Barr ウイルス, HHV-8

HHV に共通の特徴として持続的な潜伏感染をすることが挙げられる。潜伏感染とは、各 HHV の初期感染後に、HHV の種類に応じた組織あるいは細胞においてウイルス粒子が検出されない状態で潜んでいることである。潜伏感染したウイルスは、特に宿主免疫機能の低下を契機とし再活性化しウイルス粒子を形成、再増殖し病態を再発させる¹。

単純疱疹は HSV-1 および HSV-2 の感染症であり、その発症した部位により、口唇・顔面ヘルペス、性器ヘルペス、カポジ水痘様発疹症、ヘルペス性歯肉口内炎など種々の診断名が用いられている。また、HSV-1 および HSV-2 は新生児ヘルペスおよびヘルペス性脳炎や髄膜炎などの起因ウイルスとしても知られている。HSV-1 および HSV-2 はいずれも初感染後に神経節に潜伏し、その後、種々の刺激によりたびたび再活性化し、粘膜・皮膚組織で増殖し単純疱疹を引き起こす。単純疱疹の再発頻度は極めて高く、初感染後 12 カ月間で 8 割の感染者が再発するとされており、肉体的および精神的に感染者の QOL を低下させている。また、性器ヘルペスは米国において青年や成人の 5 人に 1 人が患者であるとされ、最も問題となっている性感染症の 1 つである²⁻⁴。

性器ヘルペスは、HSV-1 あるいは HSV-2 により引き起こされ、性器および性器周辺に痛みを伴う水疱の形成や潰瘍を生ずる¹。抗ヘルペスウイルス剤を服用すれば病変はいつかは治癒するが、HSV は神経節に潜伏しているため、時に再活性化し、患者はその後長年にわたって再発を経験する。HSV-1 と HSV-2 では、病態や再発の傾向などに違いが認めら

れ^{4,5}, HSV-1 による性器ヘルペスは HSV-2 による性器ヘルペスに比べ、概して再発時の症状が軽い⁶⁻¹⁰。

性器ヘルペスの問題は、①繰り返し再発する、すなわち根治が困難であるため、患者にとって精神的苦痛が大きい、②感染していても無症状のままでウイルスを排出している場合が多く(70～80%)、本人も疾患に気づかないまま性交渉時の相手に移してしまう、すなわち予防が困難である、の2点に集約される。また、妊婦が性器ヘルペスに罹患し、出産時にウイルスを排出していた場合には、新生児がHSVに感染し、重篤な新生児ヘルペスを発症する危険性が高い¹¹。さらに、性器に潰瘍性病変を有すると、エイズの原因となるヒト免疫不全ウイルスを移したり、移されたりする可能性が高まることが知られており、エイズのコントロールの上でも重要な問題となっている¹²。しかし、現状では性器ヘルペスの撲滅あるいは制圧は非常に難しく、性の自由化が進む中で、先進国、開発途上国を問わず世界的に増加の一途をたどっている¹³。

VZVは、初感染時には水痘として発病する。初感染後、VZVは神経節に潜伏し、再発時には帯状疱疹として発病する¹⁴。帯状疱疹は若年においてはまれであるが、その発症率は加齢に伴い増加し、50～80歳での発症率は50%とされている¹⁵。臨床症状は、一定の神経支配領域で限局性にみられる帯状の皮疹と、神経痛様の疼痛を伴うことが特徴である。皮疹は3週間前後で自然治癒するが、高齢者では重症化し、治癒までの期間が遅延する傾向があり、また、皮疹が治癒しても、運動麻痺、瘢痕、帯状疱疹後神経痛(PHN)が後遺症として長期間残存する危険性が高い¹⁶⁻¹⁸。帯状疱疹の治療においては、疱疹発現時の症状の改善ばかりでなく、これら後遺症の予防や軽減を期待して、早期診断と抗ウイルス剤による早期治療が重要とされている。

本邦においては、核酸類似体であるアシクロビルおよびそのプロドラッグであるバラシクロビルがHSVおよびVZVに起因する感染症の治療薬として承認されている。アシクロビルやバラシクロビルは広くHSV/VZV感染症薬として用いられているが、その治療効果は十分とは言えず未だ改善の余地があるとされている。また、アシクロビルおよびバラシクロビルの1日投与量は単純ヘルペスで1g、帯状疱疹で3-4gを要し、腎障害のある患者や高齢者では慎重投与となっている。最近、欧州の数カ国で承認されたブリブジン¹⁹はアシクロビルに比

し抗 VZV 活性が改善された核酸類似体であり、带状疱疹に対する治療効果はアシクロビルに比べ、急性期の皮疹抑制効果や PHN の発症率の軽減において有意に優れていたと報告されている^{19,20}。しかし、ブリブジンは本邦において販売が中止されたソリブジンの類似体であることから、ソリブジンと同様に 5-フルオロウラシルとの併用時には薬物—薬物相互作用が危惧される²¹。

今後の高齢化に伴って带状疱疹発症例の増加が予想され、治療効果の高い新しい带状疱疹治療薬の開発が望まれている。また、将来的に、アシクロビル/バラシクロビルなどの核酸類似体に交差耐性を示すウイルスチミジンキナーゼ変異若しくはウイルス DNA ポリメラーゼ変異を有する HSV および VZV が、特に免疫不全者などで蔓延する可能性も否定できない。したがって、次世代の抗ヘルペス剤としてアシクロビル/バラシクロビルに比べて治療効果に優れ、アシクロビル/バラシクロビルの耐性ウイルスにも効果があり、さらには耐性株が出現しにくい新しい作用機作に基づく薬剤が望まれる。

アシクロビル/バラシクロビルはウイルス DNA ポリメラーゼを作用点としている。これまでに多くの研究機関において他のウイルスタンパク質(ウイルスプロテアーゼ、ウイルスリボヌクレオチドリダクターゼなど)を作用点とする薬剤の研究が行われてきたが、臨床効果が検討された薬剤は未だなかった^{22,23}。最近、ヘルペスウイルスヘリカーゼ・プライマーゼが優れた抗ヘルペス剤の作用点となり得ることが報告された^{24,25}。ヘルペスウイルスヘリカーゼ・プライマーゼは、ウイルスの増殖に必須な酵素であり、ウイルス DNA の複製の際に 2 本鎖 DNA を乖離させるとともに、DNA 複製のための RNA プライマーを合成する機能を有している。

非核酸類似体のヘルペスウイルスヘリカーゼ・プライマーゼ阻害剤として AIC316(BAY 57-1293)や BILS179BS などが開発されているが、これらは HSV に対し強力な活性を示す一方、VZV に対しては活性を示さなかった^{24,25}。Amenamenvir(ASP2151, Figure 1)は抗 VZV 活性を有するヘリカーゼ・プライマーゼ阻害剤としてアステラス製薬株式会社で創製され、アシクロビルに比べて HSV-1, HSV-2, および VZV に強力な抗ウイルス活性を示す²⁶。これまで、AIC316 および ASP2151 が性器ヘルペスあるいは带状疱疹患者を対象とした臨床試験を進めている。新規抗ウイルス剤の開発において、臨床分離株の薬剤感受性を確認し、その感受性の地域差、あるいは、薬剤耐性化についての検討を行うことは、臨床で必要

な薬剤濃度、各地域の bridging の必要性、臨床で効かない場合の考察などができ、臨床効果予測に有用である。また、その有効性を動物実験で確認し、それらの知見から臨床での効果が期待できる血漿中濃度を推定することは実際に必要な投与量を予測できる点で有用である。本研究では、ASP2151 の抗ウイルス活性の特徴を感染細胞系 (第一章) および動物系 (第二章) で明らかにし、非臨床 Pharmacokinetics/ Pharmacodynamics (PK/PD) 解析による ASP2151 の臨床推奨血漿中濃度の推定を行った (第三章)。

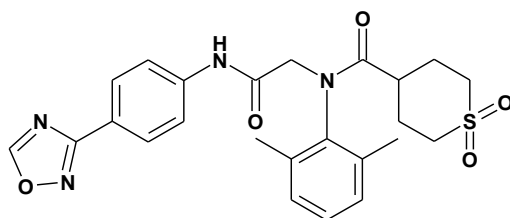


Figure 1. Molecular structure of ASP2151.

第一章 ASP2151 の HSV 臨床分離株に対する抗ウイルス活性

1 序論

抗ウイルス剤の開発において、ウイルスの薬剤感受性の株間差や地域差、さらには薬剤耐性ウイルスの出現可能性などについて十分調べておかなければならない。HSV の薬剤耐性株は、感染増殖様式と DNA 合成酵素の核酸複製の際の忠実度・正確さの高さから、容易には出現しないと考えられてきたが²⁷⁻²⁹、最近、バラシクロビル/アシクロビルを使用した一部の患者で耐性株の出現が問題となっている³⁰。アシクロビルはウイルスのチミジンキナーゼでリン酸化された後、GTP と競合することによって DNA ポリメラーゼを阻害し、また DNA 鎖に取り込まれて DNA の伸長阻止を起こすことで、DNA 合成を阻害する。チミジンキナーゼは HSV や VZV の複製において必須な酵素ではないため、チミジンキナーゼの活性が消失したウイルスも増殖でき、アシクロビル耐性株となりうる。実際、アシクロビル耐性株の 95% はチミジンキナーゼの変異株である³¹。自然界でのアシクロビル耐性 HSV の存在頻度は $1/10^3 - 1/10^4$ と報告されており³²⁻³⁶、さらに、長期の使用により免疫抑制患者や新生児の 7-14% でアシクロビル耐性 HSV が出現することが報告されている³⁷⁻⁴¹。したがって、アシクロビルと異なる作用機序を有し耐性ウイルスが出現しにくく、また、アシクロビル耐性 HSV にも有効な薬剤が望まれる。

ASP2151 は、非核酸類似体のヘルペスウイルスヘリカーゼ・プライマーゼ阻害剤であり、アシクロビルに比べて HSV-1, HSV-2, および VZV に強力な抗ウイルス活性を示す²⁶。これまでに、HSV-1 KOS 株、あるいは HSV-2 G 株, Lyon 株, Kondo 株感染細胞を高濃度 ASP2151 存在下で培養したとき、その耐性頻度は何れの株においても $1/10^6$ 程度であり、アシクロビル ($1/10^3$ 程度) に比べ有意に低いことが報告されている⁴²。酵素活性をなくす変異はウイルスが増殖できなくなるので、活性を維持できて ASP2151 と反応しないという限られた変異だけが耐性となるため、非常に少ないと考えられる。実験的に得られた ASP2151 耐性株はウイルス増殖に必須の酵素であるヘリカーゼ・プライマーゼ複合体のヘリカーゼあるいはプライマーゼ遺伝子上に変異が存在し、野生株と比較し増殖速度が有意に低く、動物に接種しても病原性を示さず、さらに、アシクロビルなどの既存抗ウイルス剤に感受性であるこ

とが示されている⁴²。このように ASP2151 耐性株が蔓延する懸念はアシクロビルより少ないことが期待されるが、自然界 HSV における ASP2151 の耐性株存在頻度は不明であり、臨床使用により耐性の顕在化も否定はできない。そこで今回、HSV 感染患者から採取された臨床分離株の ASP2151 に対する感受性をプラーク減少法で測定し、薬剤感受性の株間差や地域差、および薬剤耐性化について考察した。プラーク減少法は、ウイルスの薬剤感受性を検査するために標準的に用いられている方法である。これらを非臨床で確認しておくことで、臨床に必要な薬剤濃度、各地域での bridging の必要性、臨床で効かない場合の考察などができる。

2 実験結果

2.1 ASP2151 に対する本邦および米国臨床分離 HSV の感受性

HSV-1 および HSV-2 の増殖に対する ASP2151 およびアシクロビルの抗ウイルス活性をヒト胎児線維芽細胞 (HEF 細胞)、ならびにアフリカミドリザル腎 Vero 細胞を宿主としたプラーク減少法により比較検討した。ウイルスはアシクロビル感受性の実験室株、および本邦若しくは米国由来の臨床分離株を用いた。

HEF 細胞あるいは Vero 細胞に各ウイルスを感染させた 1～3 時間後に被験薬を添加し、感染 2 日後のプラーク数を指標に抗ウイルス活性を測定したところ、ASP2151 は用いたすべての HSV-1 および HSV-2 株に対して強い抗ウイルス活性を示した。

HEF 細胞を用いた実験では、ASP2151 の EC₅₀ (プラーク数を 50% 減少させる薬剤濃度) 値は、HSV (HSV-1 および HSV-2) に対して 0.016 μM～0.12 μM であった (Table 1)。ASP2151 の EC₅₀ 値は本邦もしくは米国由来臨床分離 HSV 株の間に顕著な差は認められなかった。一方、アシクロビルの EC₅₀ 値は 0.080 μM～0.42 μM であり、ASP2151 の抗 HSV 活性の EC₅₀ 値はアシクロビルに比べて有意に低く、1/12～1/3 であった (Table 1)。このように HEF 細胞を用いた実験においては、ASP2151 はアシクロビルよりも強力な抗 HSV 作用を示し、しかも HSV の ASP2151 に対する感受性に、本邦および米国間で地域差はないことが示唆された。

Vero 細胞を用いた実験では、Vero 細胞における ASP2151 の抗ウイルス活性の EC₅₀ 値は、HSV-1 で 0.008 μM～0.036 μM, HSV-2 で 0.014 μM～0.034 μM であり (Table 2), HEF 細胞における EC₅₀ 値と顕著な差は認められなかった (Table 3)。一方、アシクロビルの HSV-1 および HSV-2 に対する EC₅₀ 値はそれぞれ 0.73 μM～2.1 μM および 1.1 μM～3.5 μM であり、HEF 細胞における EC₅₀ 値に比べて減弱する傾向が認められた (Table 3)。

なお、Vero 細胞に対する ASP2151 およびアシクロビルの細胞毒性作用を Neutral Red 法により検討したところ、ASP2151 およびアシクロビルの Vero 細胞に対する IC₅₀ 値 (細胞増殖を 50% 抑制する濃度) はいずれも 200 μM より大きかった (Table 2)。HEF 細胞に対する両薬物の IC₅₀ 値もまた 200 μM より大きいことが報告されている²⁶。したがって、宿主細胞の感受性に薬剤の細胞毒性は影響していないものと考えられた。

Table 1. Anti-HSV-1 and -2 activities of ASP2151 and acyclovir in HEF cells

Virus strain	EC ₅₀ (μM) ^a	
	ASP2151	Acyclovir
HSV-1		
<i>Laboratory stock</i>		
KOS	0.037 ± 0.004 *	0.16 ± 0.00
<i>Clinical isolates from Japan</i>		
WT-51	0.042 ± 0.002 *	0.15 ± 0.01
<i>Clinical isolates from the USA</i>		
CI-25	0.030 ± 0.005 *	0.17 ± 0.02
CI-114	0.018 ± 0.004 *	0.092 ± 0.015
CI-116	0.016 ± 0.001 *	0.080 ± 0.010
HSV-2		
<i>Laboratory stock</i>		
G	0.056 ± 0.006 *	0.41 ± 0.09
Lyon	0.12 ± 0.00 *	0.35 ± 0.03
<i>Clinical isolate from Japan</i>		
Kondo	0.064 ± 0.006 *	0.20 ± 0.01
<i>Clinical isolates from the USA</i>		
CI-27	0.036 ± 0.005 *	0.42 ± 0.08
CI-5243	0.032 ± 0.002 *	0.20 ± 0.04

^a The virus strains used in this study consisted of three laboratory stock strains (KOS, G, and Lyon), two clinical isolates from Japan (WT51 and Kondo), and five clinical isolates from the USA (CI-25, CI-114, CI-116, CI-27, and CI-5243).

^b The antiviral activity (EC₅₀) was determined by a plaque reduction assay in infected HEF cells. The data represent the mean ± SE of four independent experiments using each strain.

* Significantly different from value for acyclovir at P<0.05 (Student's t-test).

Table 2. Anti-HSV-1 and -2 activity and cytotoxicity of ASP2151 and acyclovir in Vero cells

Virus strain	EC ₅₀ (μM) ^a	
	ASP2151	Acyclovir
HSV-1		
<i>Laboratory stock</i>		
KOS	0.027 ± 0.001 *	2.1 ± 0.2
Miyama	0.022 ± 0.001 *	1.7 ± 0.2
<i>Clinical isolates from Japan</i>		
WT-51	0.030 ± 0.001 *	0.73 ± 0.02
H-5	0.028 ± 0.001 *	1.4 ± 0.1
Miyoshi	0.036 ± 0.001 *	1.5 ± 0.1
Fujito	0.029 ± 0.001 *	1.0 ± 0.2
Endo	0.023 ± 0.001 *	1.2 ± 0.1
A4-3 (acyclovir-resistant)	0.026 ± 0.001 *	49 ± 4
<i>Clinical isolates from the USA</i>		
CI-25	0.009 ± 0.001 *	0.82 ± 0.16
CI-114	0.008 ± 0.001 *	0.97 ± 0.05
CI-116	0.010 ± 0.002 *	0.95 ± 0.07
HSV-2		
<i>Laboratory stock</i>		
G	0.025 ± 0.002 *	1.6 ± 0.2
Lyon	0.034 ± 0.002 *	2.6 ± 0.1
<i>Clinical isolate from Japan</i>		
Kondo	0.023 ± 0.001 *	1.4 ± 0.1
<i>Clinical isolates from the USA</i>		
CI-27	0.015 ± 0.002 *	3.5 ± 0.4
CI-5243	0.014 ± 0.003 *	1.1 ± 0.2
Cytotoxicity, CC ₅₀ (μM) ^b	>200	>200
SI, CC ₅₀ /EC ₅₀ ^c	>5500	>57

^a Antiviral activity (EC₅₀) was determined using the plaque reduction assay. The data represent the mean ± SE of four independent experiments using each strain

^b Data represent the mean of three independent experiments. Values for CC₅₀ were determined using Neutral Red assay in proliferating Vero cells

^c SI represents the smallest value among acyclovir-susceptible strains tested. * $P < 0.05$ as compared with ASP2151 and acyclovir (Student's t-test).

Table 3. Range of anti-HSV activities of ASP2151 and acyclovir in HEF and Vero cells

Virus	No. of strains	Host cell	ASP2151 (μM)	Acyclovir (μM)
HSV-1	5 ^a	HEF	0.016 – 0.042	0.080 – 0.17
	10 ^b	Vero	0.008 – 0.036	0.73 – 2.1
HSV-2	5 ^a	HEF	0.032 – 0.12	0.20 – 0.42
	5 ^b	Vero	0.014 – 0.034	1.1 – 3.5

^a: The data are cited from Table 1.

^b: The data are cited from Table 2 (acyclovir-susceptible strains).

2.2 ASP2151 投与前後での HSV の感受性

自然界における HSV の薬剤感受性の多様性を考慮し、多数の性器ヘルペス患者から得られた HSV 臨床分離株で ASP2151 の感受性を検討した。HSV 臨床分離株は性器ヘルペス患者を対象とした ASP2151 のフェーズ II 試験において患者への投薬前に採取したサンプルから、感受性試験実施可能な分離株として、HSV-1 5 株、HSV-2 151 株を得た。

まず、これらの HSV 臨床分離株をヒト胎児肺線維芽細胞 (HEL F) に感染させ、ウイルスの増殖に対する ASP2151 およびアシクロビルの抗 HSV 活性の EC₅₀ 値をプラーク減少法により検討したところ、HEL F 細胞における ASP2151 の抗ウイルス活性の平均 EC₅₀ 値は、HSV-1 で 0.043 μM 、HSV-2 で 0.069 μM であり、前段 (2.1 ASP2151 に対する本邦および米国臨床分離 HSV の感受性) にて得られた HEF 細胞および Vero 細胞における EC₅₀ 値 (Table 1 および 2) と顕著な差は認められなかった。一方、アシクロビルの HEL F 細胞における抗 HSV-1 活性の平均 EC₅₀ 値は 2.1 μM 、抗 HSV-2 活性では 3.2 μM であり (Figure 2)、前段にて得られた Vero 細胞における EC₅₀ 値と顕著な差は認められなかった (Table 2)。なお、薬剤投与前の患者から分離された HSV の中には、ASP2151 およびアシクロビル耐性 HSV は存在しなかった。

次に、性器ヘルペス治療の薬剤投与前後で HSV の感受性に变化があるか検討した。プラセボ、バラシクロビル (500 mg 1 日 2 回、3 日間)、あるいは ASP2151 (100, 200, 400 mg 1 日 1 回 3 日間、または 1200 mg 1 回) を投薬された性器ヘルペス患者からそれぞれ 26 株、13 株、61 株の HSV を分取し、プラーク減少法により ASP2151 およびアシクロビルに対する感受性を測定した。その結果、ASP2151 およびアシクロビルに対する HSV の感受性に薬剤

投与前後で大きな変化は見られなかった (Figure 3)。また, ASP2151 が投薬されてから最後にウイルスが分取できた時までの時間 (薬剤に曝されていた時間) と ASP2151 に対する感受性に相関は見られず (Figure 4), 暴露時間が長くなるほど耐性化するという傾向はみられなかった。

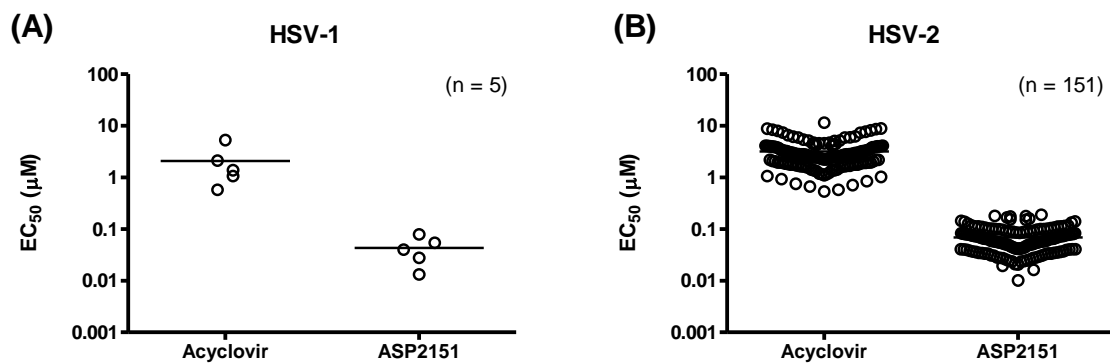


Figure 2. Susceptibility of clinical HSV-1 and HSV-2 isolates to acyclovir and ASP2151. Antiviral activities of acyclovir and ASP2151 against 5 HSV-1 and 151 HSV-2 isolates obtained from subjects before the first dosing with antiviral agents were measured using the plaque reduction assay with HELF cells. Each symbol represents the value of one experiment performed in triplicate.

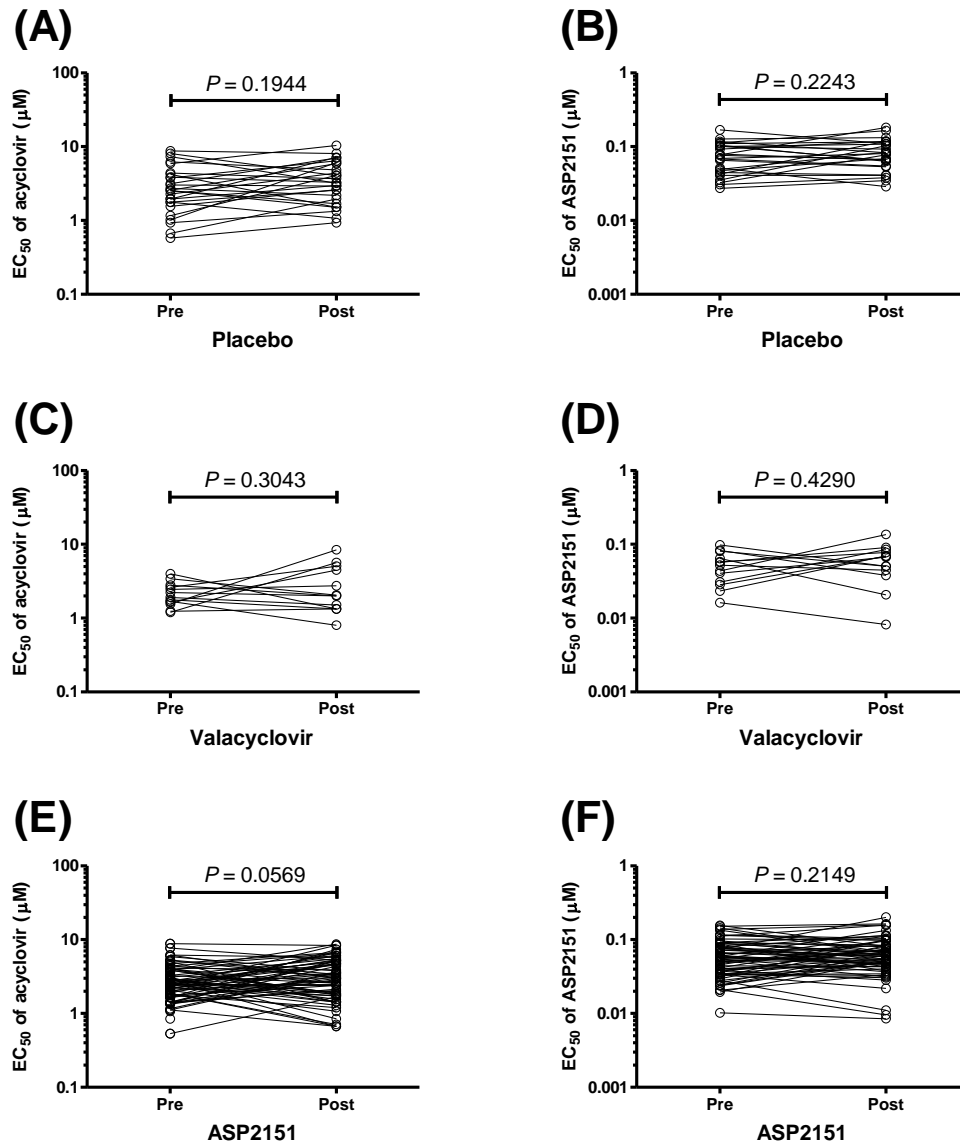


Figure 3. Susceptibility of HSV isolated from subjects before and after the first dosing with antiviral agents. Antiviral activities of acyclovir (A, C, and E) and ASP2151 (B, D, and F) against clinical isolates obtained from patients pre- or post-dosed with placebo (A and B, $n=26$), valacyclovir (C and D, $n=13$), or ASP2151 (E and F, $n=67$) were measured using the plaque reduction assay with HELF cells. Each symbol represents the value of one experiment performed in triplicate. Statistical analyses were performed using the paired Student's t-test for comparisons between pre- and post-dosing of patients with the antiviral agents.

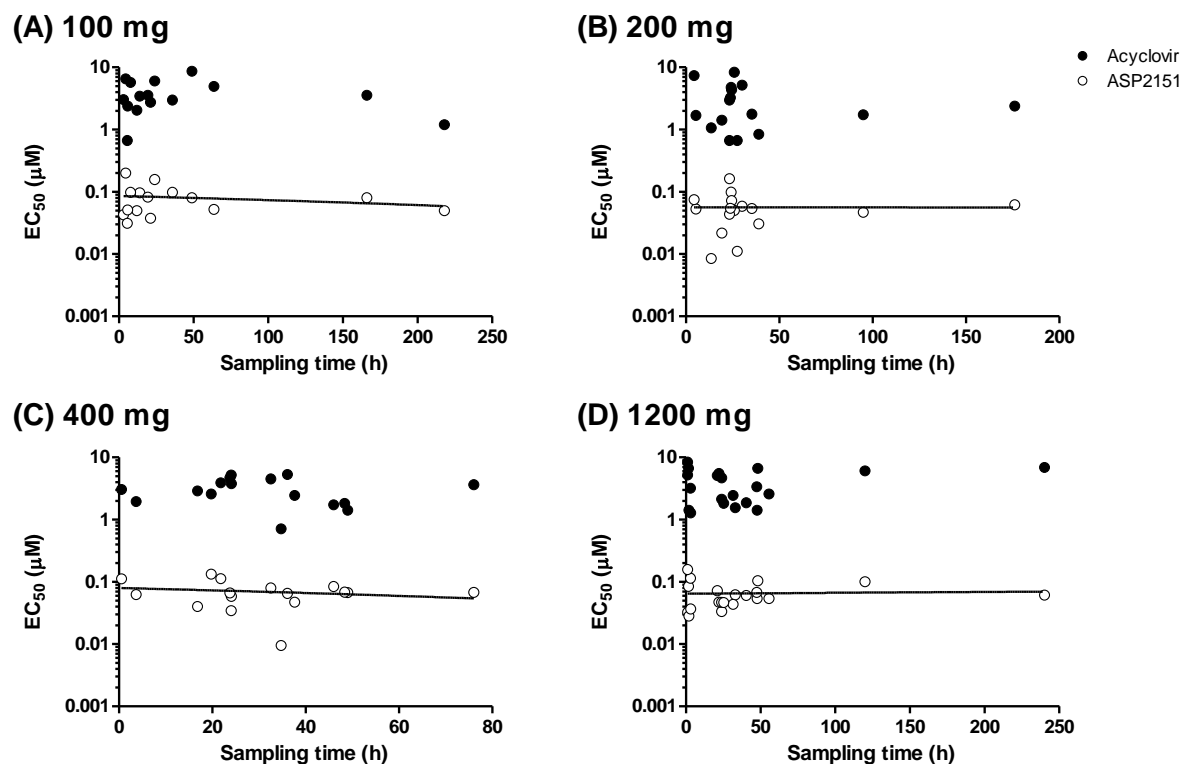


Figure 4. Relationship between antiviral activity and sampling time. Antiviral activities of acyclovir (closed circles) and ASP2151 (open circles) against clinical isolates obtained from the last positive culture for each patient after treatment with 100 mg (A), 200 mg (B), 400 mg (C), or 1200 mg (D) of ASP2151 were measured using the plaque reduction assay with HELF cells. The antiviral activities were plotted versus the sampling time of each isolate. Correlations were analyzed using a linear regression model.

3 考察

本章では ASP2151 はアシクロビルに比べ強力に HSV の増殖を抑制し、HSV の感受性に地域差は見られないことを示した。HEF 細胞において ASP2151 の HSV-1 5 株および HSV-2 5 株に対する平均 EC₅₀ 値はそれぞれ 0.029 μ M および 0.062 μ M であった (Table 4)。同じ HEF 細胞において ASP2151 の VZV 9 株に対する平均 EC₅₀ 値は 0.063 μ M であったことから (Table 4), HSV-2 および VZV は HSV-1 に対し約 2 倍感受性が低いことが示唆された。したがって、臨床使用において対象となるヘルペス感染症の起因ウイルスにより、これらの感受性の違いを考慮した用量設定をする必要があると考えられた。

アシクロビルの抗ウイルス活性 EC₅₀ 値は宿主細胞の種類により異なることが知られており⁴³, アシクロビルの抗ウイルス活性発現に必要な宿主細胞のリン酸化酵素群に多様性があるためと推察される。一方, ASP2151 はウイルスヘリカーゼ・プライマーゼ複合体に直接作用することから, その抗ウイルス活性は宿主細胞の違いに影響を受けないと推測された。さらに HEF 細胞および Vero 細胞を用いた検討から, 本邦および米国臨床分離株において ASP2151 は同程度の感受性を示し, 異なった地域に由来するウイルスに感受性の差はないことが示唆された。

薬剤耐性ウイルスの出現は抗ウイルス剤の開発および使用上の懸念の一つである。ウイルスは多様な性質を持つバリエーションの混合であり, 薬剤に暴露されることにより低感受性株だけが残存し増殖する可能性がある。実際, HSV 感染 Vero 細胞を高濃度の ASP2151 存在下で 7 日間培養したところ, HSV 8 株中 1 株で ASP2151 低感受性株が増殖したことが報告された⁴²。実験的には耐性ウイルスは容易に選択されるが, 臨床においては患者の免疫力や薬物の血漿中濃度の個人差などが多様であるため, 耐性ウイルスの出現を予測することは困難である。実際, アシクロビル/バラシクロビルは世界中で広く使用されているのにも拘らず, 健常者においては耐性ウイルスが問題となることはほとんどない。一方, がん治療患者, 移植患者あるいは HIV 患者など免疫不全患者から分離された株の約 5% はアシクロビル耐性株と報告されている^{44,45}。健常者は耐性株が出現しても免疫反応によりウイルスを排除することができるが, 免疫不全患者ではそれができないため耐性ウイルスが出現しやすいと考

えられる。現在の治療薬はいずれも DNA ポリメラーゼを標的としており、交差耐性が報告されていることから、これらの耐性菌にも有効な新規機序の薬剤が望まれる。

HSV ヘリカーゼ・プライマーゼ阻害剤の AIC316 は、実験室株においては $0.5\text{--}4.5 \times 10^{-6}$ の頻度で耐性株が存在すると報告された²⁵。16–20%の臨床分離株においては、高濃度の AIC316 存在下で培養すると実験室株よりも 10–100 倍高い存在頻度で耐性株が見つかることが報告されている^{46,47}。しかしながら、AIC316 の性器ヘルペス再発抑制治療での 28 日間の投与では耐性株は見つからなかった⁴⁸。このように実験的には AIC316 耐性株は容易に分離できるが、実際の臨床においてはこれまでのところ耐性株出現の報告はない。

AIC316 の *in vitro* 実験で用いられた臨床分離株における ASP2151 耐性株の存在頻度は不明であるものの、ASP2151 は、*in vitro* では耐性頻度が 1.19×10^{-6} で、アシクロビルの耐性頻度 1.65×10^{-3} に比べ有意に低いことに加え、ASP2151 耐性株は増殖速度が野生株に比べ遅いことが示されている⁴²。さらに、ASP2151 耐性株はマウスに感染しなかった⁴²。

ASP2151 耐性株のこうした特徴、ならびに、今回性器ヘルペスに対する治療効果を検討した臨床試験で耐性株が出現しなかったことから、臨床においても ASP2151 耐性 HSV が出現する懸念は極めて低いと考えられた。

Table 4. Mean antiviral activity EC₅₀ values of ASP2151 against HSV and VZV in HEF cells

Virus	No. of strains	ASP2151 (μM)	ASP2151 (ng/mL)
HSV-1	5	0.029 ^a	14 ^a
HSV-2	5	0.062 ^a	30 ^a
VZV	9	0.063 ^b	30 ^b

^a: The data are calculated from Table 1.

^b: The data are calculated from the susceptibility of the acyclovir-susceptible VZV strains of the previously published paper²⁶.

第二章 HSV 感染動物モデルにおける ASP2151 の抗ウイルス活性

1 序論

ヘルペス感染症のヒトでの病態および治療薬の効果を予測する上で、動物感染モデルは有用である。HSV 感染では、動物種・ウイルス型(株)・感染ルート・免疫状態などにより病態が変わり、例えば、マウスへの経鼻感染ではヘルペス脳炎様症状、マウス角膜に感染させれば角膜ヘルペス様症状、ヘアレスマウスへの経皮感染では带状疱疹用症状、モルモットの膣粘膜への感染では性器ヘルペス様症状を発症し、これら動物感染モデルは病態の解明や、薬剤・ワクチン開発に貢献している。

モルモットを用いた HSV-2 感染モデルはヒトの性器ヘルペスを良く反映したモデルとして知られている^{49,50}。HSV-2 の初感染の後、膣に水疱形成を認め、局所での症状ならびに病態の進行はヒトに見られる病態と良く似ている^{49,51-55}。そこで今回、ASP2151 の抗ウイルス活性を HSV-2 感染モルモットモデルにおいて検討した。さらに ASP2151 の治療効果が、ウイルス増殖阻害効果に基づくことを HSV-2 感染モルモットモデルおよびマウス HSV-1 皮膚感染モデルを用いて検討した。

2 実験結果

2.1 ASP2151 およびバラシクロビルのモルモット HSV-2 膣感染モデルにおける効果

2.1.1 予防効果

モルモット HSV-2 膣感染モデルを用いて ASP2151 とバラシクロビルの抗 HSV-2 効果を比較検討した。雌性モルモットの膣に HSV-2 G 株を感染させ、ASP2151 (0.3, 1, 3, 10, または 30 mg/kg)、バラシクロビル (30, 100, または 300 mg/kg) もしくはプラセボ (0.5% メチルセルロース (MC) 水溶液) を 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した。その結果、ASP2151 およびバラシクロビルは HSV-2 膣感染モルモットにおける経日的なスコア上昇を抑制し、ASP2151 は

0.3 mg/kg bid 以上, またバラシクロビルは 100 mg/kg bid 以上の用量において有意にスコア一日数曲線下面積 (AUC) を減少させた (Figure 5)。ASP2151 およびバラシクロビルの ED₅₀ 値はそれぞれ 0.37 mg/kg bid および 68 mg/kg bid であり, モルモット HSV-2 膣感染モデルにおいて ASP2151 はバラシクロビルより約 184 倍強力な効果を示した。

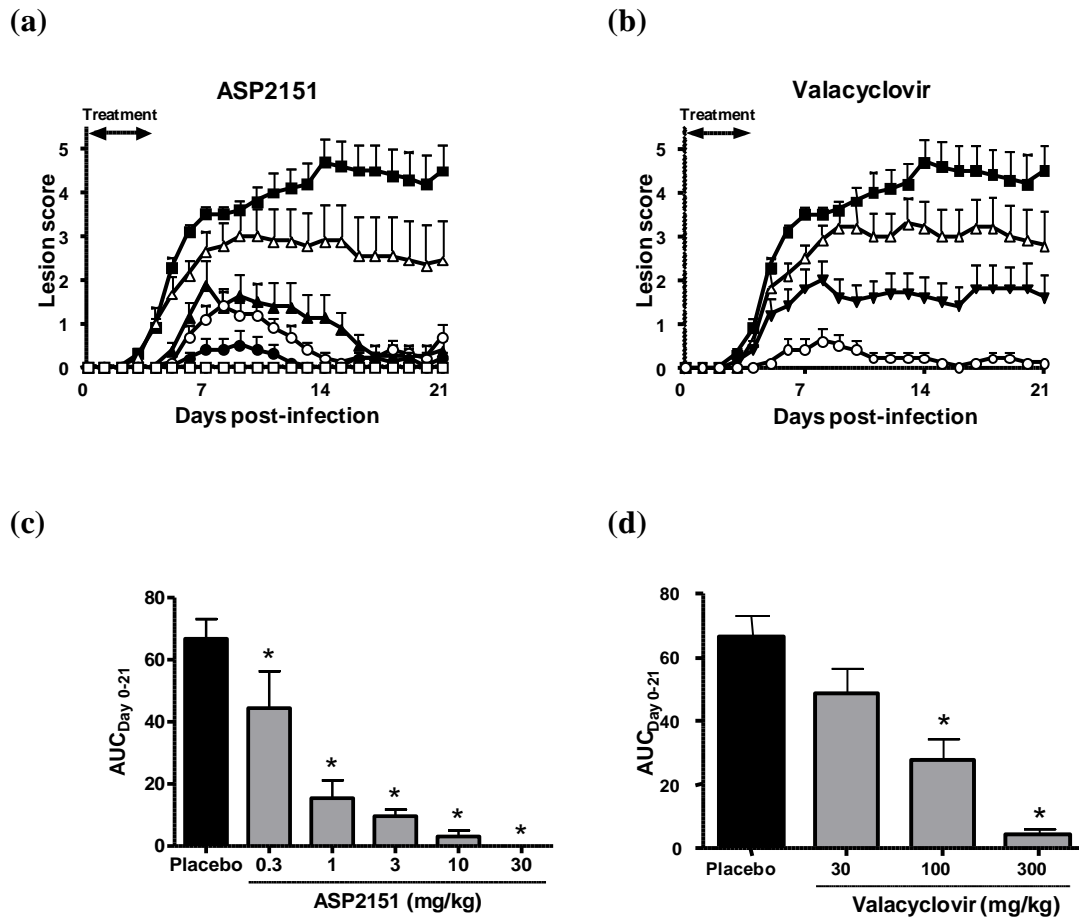


Figure 5. Efficacies of ASP2151 and valacyclovir on genital herpes symptoms in a guinea pig model of HSV-2 infection. Guinea pigs vaginally infected with HSV-2 were orally administered placebo (closed square); ASP2151 at a dose of 0.3 (open triangle), 1 (closed triangle), 3 (open circle), 10 (closed circle), or 30 mg/kg (open square); or valacyclovir at a dose of 30 (open triangle), 100 (closed triangle), or 300 mg/kg (open circle) twice daily from Days 0 to 4 post-infection. The mean disease scores for ASP2151- (a) or valacyclovir-treated (b) groups were calculated and plotted against days post-infection; (c) and (d) represent the area under the disease score-time curve from Days 0 to 21 post-infection ($AUC_{Day0-21}$; score \times day). Data are expressed as the mean + SE of 8–10 animals per group. * $P < 0.05$, compared with the placebo group (Dunnett's multiple comparison test).

2.1.2 治療効果

初発型を含む性器ヘルペス患者は主にその病状発症後に来院し、それ以降に投薬が開始されていると考えられる。そこで、モルモット HSV-2 膣感染モデルにおいて膣病変発症後に ASP2151 あるいはバラシクロビル投与を開始し、その後の症状を観察した。

HSV-2 感染 4 日後に膣病変が確認されたモルモットに対し、ASP2151 (1, 3, 10, または 30 mg/kg), バラシクロビル (30, 100, または 300 mg/kg) もしくはプラセボ (0.5% MC 水溶液) を感染 8 日後まで 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した。膣病変の程度および一般状態に応じた 0–6 のスコアを設定し、感染 9 日後まで毎日観察した。

プラセボ投与群は経日的にスコアが上昇したが、ASP2151 およびバラシクロビルはスコア上昇を抑制した (Figure 6)。ASP2151 は用量依存的に AUC を減少させ、3 mg/kg 以上で有意であった。一方、バラシクロビルは 300 mg/kg の用量で AUC を有意に減少させた。バラシクロビル 300 mg/kg 群の AUC に対し ASP2151 の 10 mg/kg および 30 mg/kg 群の AUC は有意に小さかった (Figure 6)。

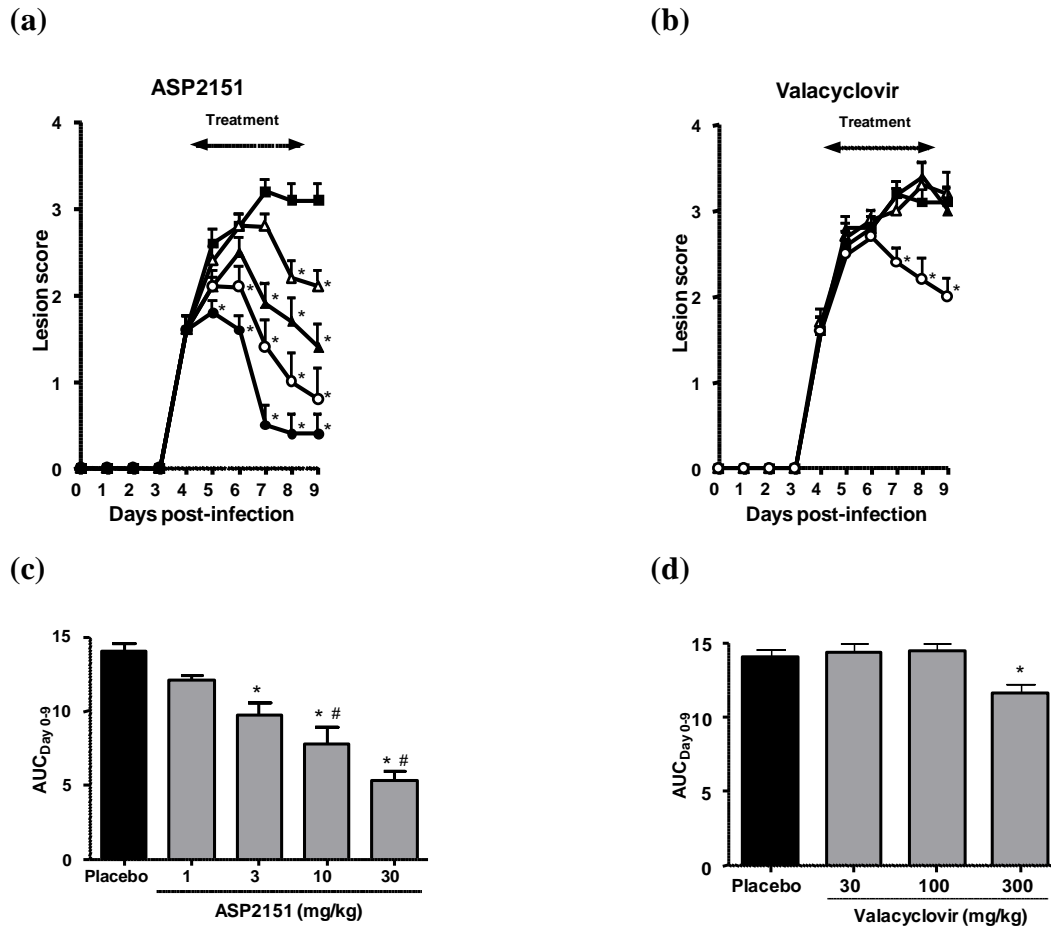


Figure 6. Therapeutic efficacies of ASP2151 and valacyclovir on genital herpes symptoms in a guinea pig model of HSV-2 infection. Guinea pigs vaginally infected with HSV-2 were orally administered placebo (closed square); ASP2151 at a dose of 1 (open triangle), 3 (closed triangle), 10 (open circle), or 30 mg/kg (closed circle); or valacyclovir at a dose of 30 (open triangle), 100 (closed triangle), or 300 mg/kg (open circle) twice daily from days 4 to 9 post-infection. The mean disease scores for each ASP2151- (a) or valacyclovir-treated group (b) were calculated and plotted against days post-infection. * $P < 0.05$, compared with the placebo group (Dunnett's multiple comparison test); (c) and (d) represent the area under the disease score-time curve from days 0 to 9 post-infection. Data are expressed as the mean + SE of 10 animals per group. * $P < 0.05$, compared with the placebo group (Dunnett's multiple comparison test). # $P < 0.05$, compared with the AUCs of valacyclovir 300 mg/kg treatment group (Tukey's multiple comparison test).

2.1.3 治療効果検討試験における ASP2151 およびバラシクロビルの膣内 HSV-2 ウイルス価減少効果

モルモット HSV-2 膣感染モデルを用いて膣病変発症後から ASP2151 あるいはバラシクロビルを投与したときの、膣内 HSV-2 ウイルス価に対する効果を比較検討した。HSV-2 感染 4 日後に膣病変が確認されたモルモットに対し、ASP2151 (10 もしくは 30 mg/kg)、バラシクロビル (300 mg/kg)、またはプラセボ (0.5% MC 水溶液) を感染 4 日後から感染 7 日後まで 1 日 2 回 4 日間反復経口投与した。感染 5 日後 (1 日間投与翌日) および感染 8 日後 (4 日間投与翌日) での膣内 HSV-2 ウイルス価をプラーク法により定量した。感染 5 日後 (1 日間投与翌日) におけるモルモット膣内平均 HSV-2 ウイルス価 (\log_{10} PFU) はプラセボ投与群で 2.57 であった (Figure 7)。バラシクロビル 300 mg/kg 投与での平均 HSV-2 ウイルス価は 2.06 であり、プラセボ投与群との間に有意差は認められなかった。一方、ASP2151 10 mg/kg 群 および 30 mg/kg 群の平均 HSV-2 ウイルス価はそれぞれ 0.94 および 0.70 であり、プラセボ群との間に有意差が認められた。

ASP2151 はモルモット HSV-2 膣感染モデルにおいて HSV-2 排出を強く抑制することが示された。なお、感染 8 日後 (4 日間投与翌日) における膣内 HSV-2 ウイルス価は、全群で検出限界以下であった (data not shown)。

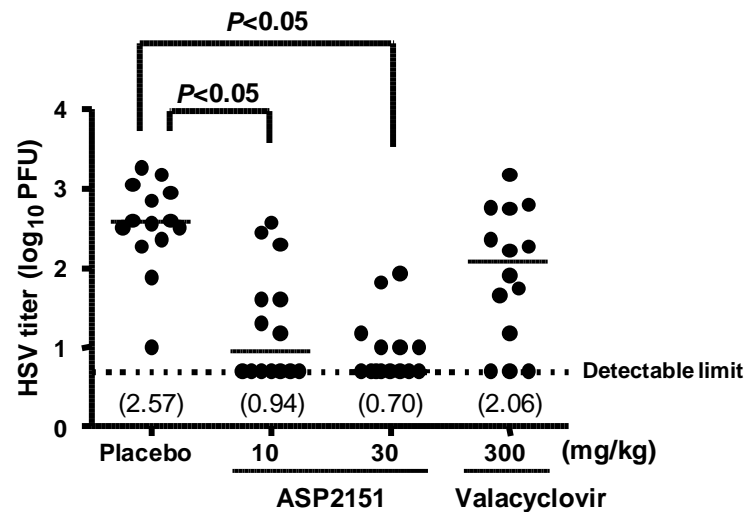


Figure 7. Efficacies of ASP2151 and valacyclovir on genital titers on day 5 post-infection in a guinea pig model of HSV-2 infection. Each datum point represents the HSV-2 titer for each animal in the respective treatment groups ($n = 14$). The horizontal line of each group marks the median HSV-2 titer level with the viral titers indicated in parentheses. The horizontal dotted line represents the detection limit of the assay. $P < 0.05$, comparison with placebo was statistically analyzed using Steel's multiple comparison test.

2.2 マウス HSV-1 皮膚感染モデルにおける皮膚病変と皮内 HSV-1 ウイルス価の関係

モルモット性器ヘルペスモデルにおいて ASP2151 が HSV-2 の増殖を抑制し、病態が改善されていることが示唆されたが、他の動物種での HSV 感染モデルにおいても同様に ASP2151 がウイルス増殖抑制効果、ならびに病態改善効果を示すか検討した。

マウス HSV-1 皮膚感染モデルは、モルモット性器ヘルペスモデルと同様に抗ヘルペス薬の評価系などに良く利用されている^{26,56}。その病態は、HSV-1 の初感染の後マウスの皮膚に水疱形成を認め、片側性の皮膚に感覚神経に沿って帯状の水疱さらには潰瘍を形成する。それらはヒトの帯状疱疹に類似した皮膚病変である。本実験では、HSV-1 皮膚感染モデルにおける皮膚病変と皮内 HSV-1 ウイルス価の関係について検討した。

マウス HSV-1 皮膚感染モデルにおいて、皮内 HSV-1 ウイルス価は皮膚病変が出現する前より検出され、皮膚病変が軽度である感染 4–5 日後にピークを示した (Figure 8)。その後、皮膚病変が経目的に進展するのに対し、皮内 HSV-1 ウイルス価は減少し感染 10 日後以降は検出限界値以下となった。

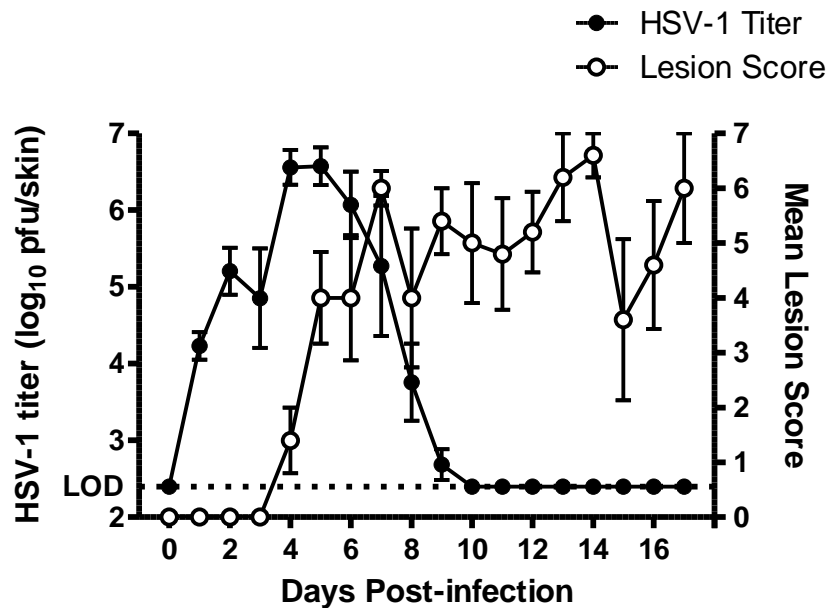


Figure 8. (a) Representative disease symptoms in a murine model of HSV-1 infection. (b) Time course (days post-infection) of changes in lesion score and intradermal virus titer in HSV-1-infected mice. Mice were infected with HSV-1 strain WT51 in the dorsolateral skin. Lesion scores (0–7) were determined for each animal on day 5 post-infection. Intradermal HSV-1 titer (expressed as log₁₀ pfu/skin) was determined by plaque assay on day 5 post-infection. Data represent the mean \pm standard error of 1–5 animals for lesion score and HSV-1 titer. The dotted line indicates the lower limit of detection (LOD, 2.40 log₁₀ pfu/skin) for the titration assay. Courses of lesion score and intradermal HSV-1 titer were plotted versus days post-infection.

2.3 ASP2151 の皮内 HSV-1 ウイルス価減少効果

マウス HSV-1 皮膚感染モデルにおいて、感染 4 日後より、ASP2151 を 3, 10, 30, 100, および 300 mg/kg/day を分 3 で 3 日間経口投与した。感染 4～7 日後の皮膚内の HSV-1 価をプラーク法により測定したところ、プラセボ投与群で感染 6 日後から皮内 HSV-1 ウイルス価が減少したのに対し、ASP2151 投与群は、感染 5 日後より皮内 HSV-1 ウイルス価が減少し、3–30 mg/kg の ASP2151 投与により皮内 HSV-1 ウイルス価を用量依存的に減少させた。30–300 mg/kg の用量では同程度の皮内 HSV-1 ウイルス価減少効果を示した (Figure 9)。

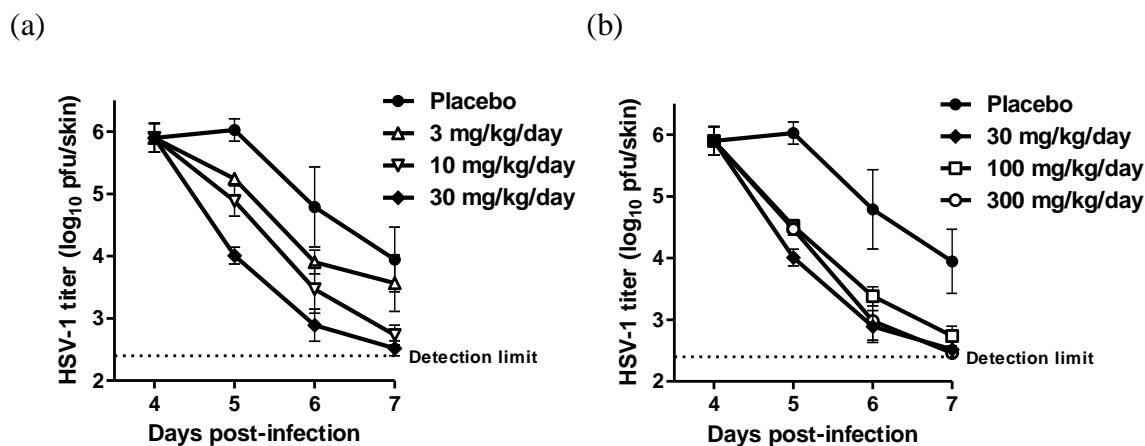


Figure 9. Reducing effect of ASP2151 on the intradermal HSV-1 titer. HSV-1-infected mice were orally treated for 1, 2 or 3 days from day 4 post-infection with vehicle or ASP2151 [(a) 3, 10 and 30 mg/kg/day, (b) 30, 100 and 300 mg/kg/day which were administered separately as three daily doses]. Intradermal HSV-1 titer (log₁₀ pfu/skin) was determined by plaque assay on days 4, 5, 6, and 7 post-infection. Data are expressed as mean \pm SE of four or five animals. The dotted line indicates the lower detection limit (2.40 log₁₀ pfu/skin) for the titration assay.

3 考察

ASP2151 は、*in vitro* において HSV-1, HSV-2 および VZV に強力な抗ウイルス活性を持ち、その効果はこれまでにマウス HSV-1 感染モデル、マウス HSV-2 耳介感染モデルおよびマウス HSV-1 感染角膜ヘルペスモデルで確認されている^{26,57,58}。本章では、さらに *in vivo*

における ASP2151 のウイルス増殖抑制効果をモルモット性器ヘルペスモデルおよびマウス HSV-1 皮膚感染モデルにおいて検証した。モルモット性器ヘルペスモデルにおいて、ASP2151 は病変発症前投与のみならず発症後投与においても、バラシクロビルより低用量で性器の病変の発症および進行を抑制すること、さらに HSV-2 排出を抑制することを示した。さらに、マウス HSV-1 皮膚感染モデルにおいても ASP2151 の発症後投与において皮内 HSV-1 ウイルス価減少効果を確認した。これらの結果は、マウス HSV-2 耳介感染モデルやマウス HSV-1 感染角膜ヘルペスモデルなど他の感染モデルでの結果と同様だった^{26,57,58}。今回、ヒトでの病態を良く反映したモルモット性器ヘルペスモデルおよび帯状疱疹様の病変を示すマウス HSV-1 皮膚感染モデルにおいて ASP2151 の効果を確認できたという知見は、患者数の比較的多い性器ヘルペスおよび帯状疱疹を対象とした臨床試験を進める上で重要かつ必要な発見である。

臨床において、アシクロビル/バラシクロビルは比較的安全で有用な薬剤として知られているが、薬効発現には病変発症後 24 時間以内の治療開始が必要であることが報告されており^{59,60}、アシクロビル/バラシクロビルの治療時間域は狭いことが示唆されている。今回、モルモット性器ヘルペスモデルの発症後投与において、ASP2151 は投与翌日から病変進行を有意に抑制したが、バラシクロビルは投与 3 日後より有意な効果を示した (Figure 6) ことから、ASP2151 はバラシクロビルよりオンセットが早いことが示唆された。モルモットにおいて、アシクロビルの治療開始が感染後 72 時間以上経過するとほとんど効果を示さないことは広く報告されており⁶¹⁻⁶³、一方、ヘリカーゼ・プライマーゼ阻害剤である AIC316 は、病変発症後 (感染 4 日後) からの投与によりバラシクロビルに比べ強力な効果を示すことが報告されている²⁵。これらのことから、ヘリカーゼ・プライマーゼ阻害剤は早いオンセットを示す点でバラシクロビルより優れている可能性がある。

性器ヘルペス再発患者において、再発症状の有無にかかわらず一過的な HSV の排出は起きており、HSV の伝播は患者やそのパートナーにおいては最も大きな懸案事項の一つである。バラシクロビルは、その予防的治療により性器ヘルペスの伝播を有意に抑制することが示されており⁶⁴、性器ヘルペス伝播抑制の適応が承認されている。しかしながら、バラシクロビルおよびアシクロビルは、HSV 排出の頻度および排出量を効果的に抑制するが、完

全に抑制することはできない⁶⁵。毎日服用しても完全に HSV 排出を抑制できなければ患者やパートナーにとっては問題であり、HSV 排出を強力に抑制する薬剤が望まれている。

ASP2151 (30 mg/kg) はモルモットでの初感染に対する予防的治療において完全に症状発症を抑制した (Figure 5)。再発に対する長期予防的治療の効果は検討していないが、他のヘリカーゼ・プライマーゼ阻害剤である AIC316 および BILS179BS は、モルモット性器ヘルペスモデルにおける長期の抑制的投与により再発頻度および HSV 排出を抑制することが報告されている^{24,25,66}。一方、バラシクロビルはモルモット性器ヘルペスモデルの発症後投与実験において、HSV 排出作用をほとんど示さなかった (Figure 7)。バラシクロビルおよびアシクロビルはモルモットにおける長期抑制的投与では HSV 排出を抑制できないことが報告されている^{66,67}。これらのことから、ASP2151 はバラシクロビルよりも高い HSV 排出抑制効果を示すことが考えられた。したがって、ASP2151 も再発症状およびウイルス伝播に効果を示すことが期待される。

一方、バラシクロビルは ASP2151 より治療効果が弱かったが、薬物動態が動物種により異なることも考慮する必要がある。実際モルモットは、ヒト、マウスおよびイヌと異なり、バラシクロビルの代謝が速いという報告がある⁶⁶。そのため、本モルモット性器ヘルペスモデルにおいてバラシクロビル投与後の血漿中アシクロビル濃度を調べたが、300 mg/kg 投与群でのみ臨床でのトラフ値を超えていることを確認した (data not shown)。また、300 mg/kg を超える用量のバラシクロビルは、モルモットに体重減少などの毒性を示すため投与できなかった。したがって、臨床において ASP2151 はバラシクロビルと同等かそれ以上の活性を示すことが示唆された。

以上より、ASP2151 の抗ウイルス効果が動物モデルでも確認できた。臨床においてヘルペスウイルスを起因とする病態に広く効果を持つ可能性が示唆された。

第三章 Pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) 解析による臨床推奨血漿中濃度の推定

1 序論

薬剤の臨床効果を予測する際、非臨床における PK/PD 解析から有用な情報を得ることができる。これまで、多くの抗菌剤や抗ウイルス剤の臨床用量設定において、非臨床 PK/PD 解析が用いられてきた⁶⁸⁻⁷¹。抗菌剤においては、PD パラメータとして最小阻害濃度 (MIC) が広く用いられてきた。これに PK パラメータを組み合わせた PK/PD パラメータとして、1 日当たり血漿中濃度が MIC を超えている時間 ($T_{>MIC}$)、最大血漿中濃度を MIC で割った値 (C_{max}/MIC)、および 1 日当たりの濃度－時間曲線下面積を MIC で割った値 (AUC/MIC) の 3 つがしばしば使われている。しかし、抗ウイルス剤は増殖抑制剤であり殺ウイルス作用を有さないため、MIC のようなコンセンサスの得られている PD パラメータはない。一般的には、抗ウイルス効果の測定エンドポイントは標準化されていないので、適切な PK/PD マーカーの創出は難しい。抗 HIV 剤においては、標準血中濃度を *in vitro* におけるウイルス増殖の阻害濃度を PD パラメータとして算出したり、HIV 患者における血漿中薬物濃度と臨床効果からレトロスペクティブに算出されてきた。*In vitro* での IC_{50} や EC_{50} といった値を PD パラメータとして用いられているが、最終的なゴールはウイルス増殖を完全に抑制することであるため、 EC_{95} の方がより適した PD パラメータであるかもしれない⁷²。しかしながら、*in vivo* で有効となる阻害濃度の探索には多くの因子の影響を受ける。すなわち、蛋白結合率、組織分布、活性代謝物の存在、耐性の出現など *in vivo* における薬効に影響する因子を考慮しなければならない。それゆえ、抗 HSV 剤の薬効に相関する PK/PD パラメータを考察するには、動物モデルでの検討結果から考察するのが適切であると考えられる。HSV は HIV とは異なり実験動物に感染するウイルスであるが、これまで抗 HSV 剤の薬効に相関する PK/PD パラメータは検討されていなかった。

ヘルペスウイルス感染症における抗ヘルペス剤の薬効とは、ウイルスの増殖を早期に抑制することであり、これにより病態の進行を抑制しウイルスによる皮疹の治癒を促進すると考えられる。第二章では、HSV-1 皮膚感染モデルにおいて ASP2151 の薬効は 30 mg/kg/day

分3でプラトーに達することを見出した。そこで、第三章では ASP2151 の *in vivo* での抗 HSV-1 作用, 特に HSV-1 の増殖を完全に抑制する作用に関する PK/PD パラメータを推定するために、非臨床 PK/PD 解析を実施した。

2 実験結果

2.1 PD 解析

マウス HSV-1 皮膚感染モデルにおいて、1 日総用量を分割回数を変えて投与する Dose-fractionation 法を用いて HSV-1 増殖を完全に抑制するときの ASP2151 の PK/PD パラメータを探索した。

マウスの背皮部に HSV-1 WT51 株を感染させ、その 2-3 時間後より ASP2151 を 25% Cremophor[®]EL/25% polyethylen glycol (PEG400) 水溶液として 1 日総用量(1, 3, 10, 30, または 100 mg/kg/day)を 1 日 1 回、もしくは 2 回または 3 回に分割して 5 日間反復経口投与した。投与終了翌日(感染 5 日後)に HSV-1 感染により発症した皮膚病変の程度および一般状態に応じて 0-7 のスコアを設定し評価した。その後、病変部位の皮膚を採取しプラーク法により皮内 HSV-1 ウイルス価を測定した。

皮膚病変スコアおよび皮内 HSV-1 ウイルス価は ASP2151 の 1 日総用量に応じて減少した (Figure 10a and 10b)。ASP2151 の経口投与により皮内 HSV-1 ウイルス価がほぼ検出限界値に達した用法・用量は 30 mg/kg/day (1 日 3 回分割投与) および 100 mg/kg/day (1 日 2 回分割投与) であった。各マウスにおいて、皮膚病変スコアと皮内 HSV-1 ウイルス価の相関関係を確認したところ、皮内 HSV-1 ウイルス価が約 5 log₁₀ pfu/skin 以下では皮膚病変は発症していなかった (Figure 10c)。

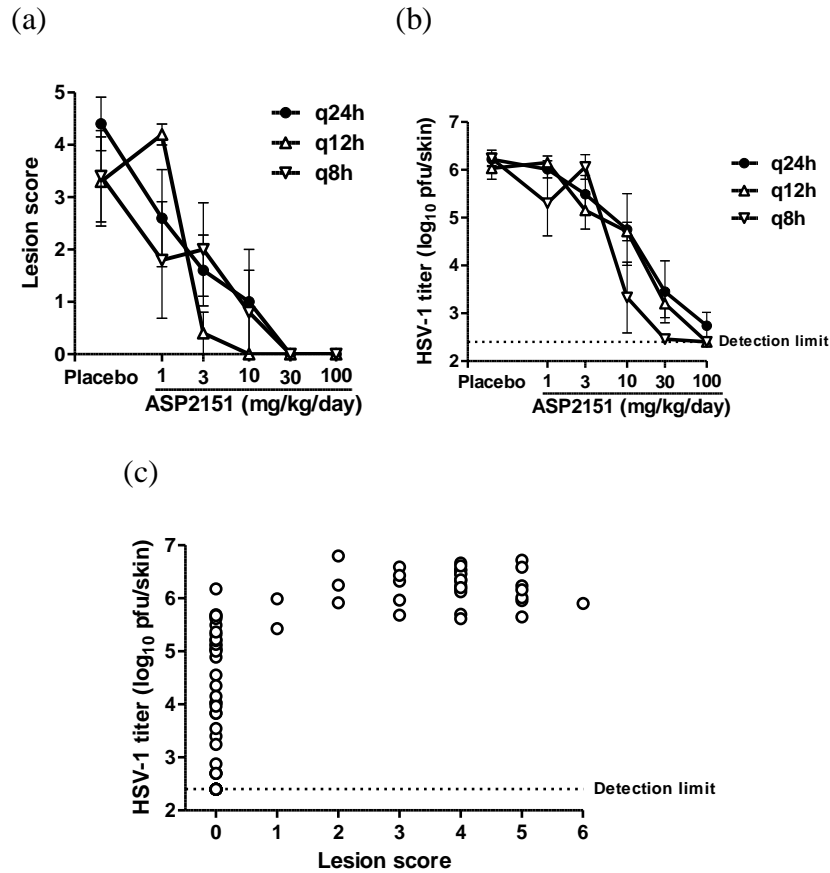


Figure 10. Effect of ASP2151 on lesion development and intradermal virus titer in HSV-1-infected mice treated with various doses of ASP2151 administered in a single, two, or three divided doses. HSV-1-infected mice were orally administered placebo (vehicle) and ASP2151 (1, 3, 10, 30, or 100 mg/kg/day) either as a single dose (q24h) or as two (q12h) or three (q8h) divided doses for 5 days starting 2–3 h after HSV-1 infection. (a) Lesion score (0–7) was determined for each animal on day 5 post-infection. (b) Intradermal HSV-1 titer (\log_{10} pfu/skin) was determined by plaque assay on day 5 post-infection. Data are expressed as mean \pm SE of four or five animals. (c) Intradermal HSV-1 titers were plotted versus lesion scores for corresponding animals. The dotted line indicates the lower detection limit (2.40 \log_{10} pfu/skin) for the titration assay.

2.2 PK 解析

ヘアレスマウスに ASP2151 を 25% Cremophor[®]EL/25% PEG400 水溶液として 0.33, 3, 30, 100 mg/kg の用量で単回経口投与した後の血漿中 ASP2151 濃度推移を検討した (Figure 11a)。血漿中 ASP2151 濃度は用量にほぼ比例して増加した。この PK 検討結果を用いたシミュレーションより, ASP2151 の経口投与により皮内 HSV-1 価がほぼ検出限界値に達した用法・用量は 30 mg/kg/day (1 日 3 回分割投与) および 100 mg/kg/day (1 日 2 回分割投与) での血漿中 ASP2151 濃度のトラフ値は約 100 ng/mL と予測された (Figure 11b)。

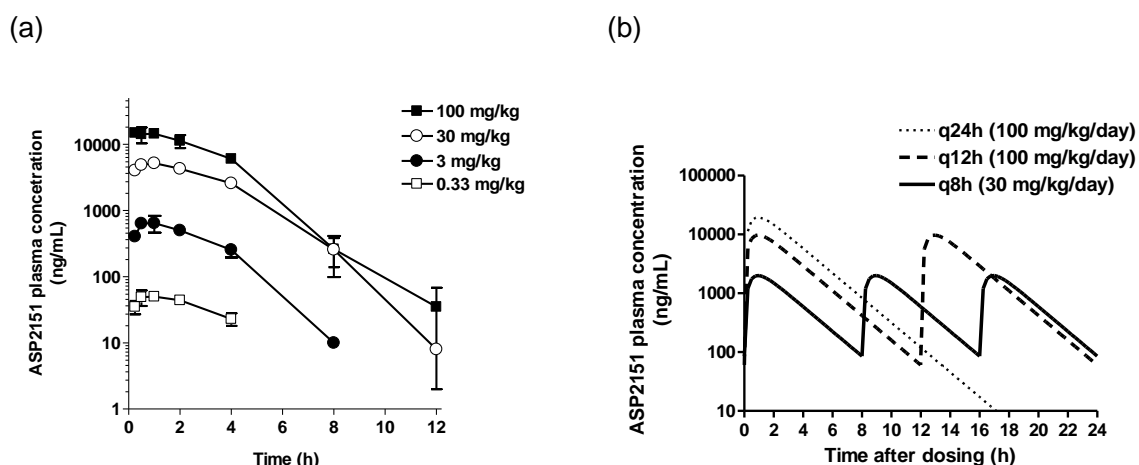


Figure 11. Plasma concentrations of ASP2151 after single or repeated oral administration to mice. (a) Plasma concentrations of ASP2151 were determined at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, and 12 h after single oral administration to mice at doses of 0.33, 3, 30, and 100 mg/kg. Data are expressed as the mean \pm SD of two or three animals. (b) Simulation of plasma concentrations after repeated oral administration. The plasma concentration measured after single oral administration at a dose of 30 mg/kg was analyzed by employing the one-compartment model. Based on this result, plasma concentration after repeated administration was simulated at 15-min intervals. Simulated plasma concentrations of ASP2151 at dosages of 100 mg/kg/day q24h, 100 mg/kg/day q12h, and 30 mg/kg/day q8h are plotted.

2.3 マウス HSV-1 皮膚感染モデルでの Dose-fractionation 法を用いた PK/PD 解析

次に, Dose-fractionation 法で実施した全ての用法・用量における血漿中 ASP2151 濃度パターンをシミュレーションし, PK マーカーとして C_{\max} 値, AUC_{24h} 値, および $T_{>100}$ 値(血漿中濃度が 100 ng/mL 以上となる 1 日内の時間)を推定した。皮内 HSV-1 ウイルス価を PD マーカーとし各 PK マーカーとの PK/PD 相関解析を行った。

皮内 HSV-1 ウイルス価は C_{\max} 値, AUC_{24h} 値, ならびに $T_{>100}$ 値いずれとも負の相関を示した(Figure 12)。PK/PD 解析における相関曲線より, 皮内 HSV-1 ウイルス価が検出限界値以下に達する時の各 PK マーカーの値は, C_{\max} 値で 10000 ng/mL, AUC_{24h} 値で 60 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$, $T_{>100}$ 値で 21–24 時間と推察された(Figure 12)。

感染日から経口投与を開始した場合, これらの PK マーカーの値を得ることができる ASP2151 の用法・用量で HSV-1 増殖をほぼ完全に抑制できると考えられた。

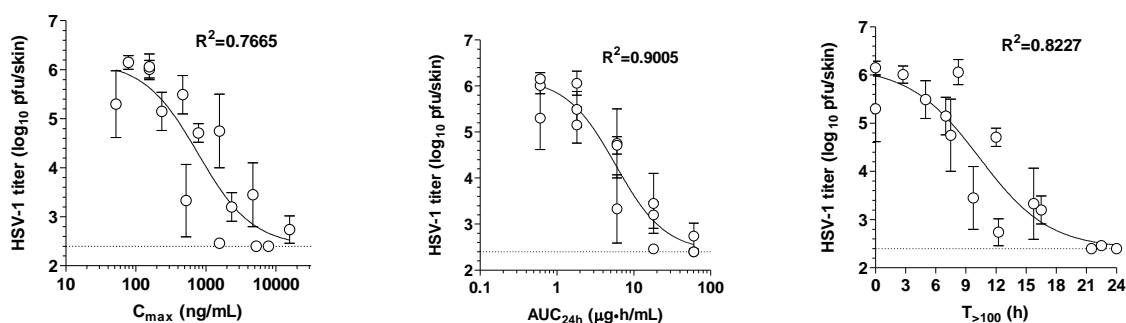


Figure 12. Relationship between intradermal HSV-1 titer and three pharmacokinetic (PK) parameters. PK parameters C_{\max} , AUC_{24h} , and time above 100 ng/mL ($T_{>100}$) were calculated under conditions of repeated ASP2151 administration either as a single dose or as two or three divided doses (1, 3, 10, 30, and 100 mg/kg/day) in mice. The PK parameters were plotted versus intradermal HSV-1 titer for animals treated with each regimen. Correlations were analyzed using a sigmoid- E_{\max} model. Data are expressed as the mean \pm SE of five animals. The dotted line and R^2 indicate the lower limit of detection (2.40 log₁₀ pfu/skin) for the titration assay and the coefficient of determination, respectively.

2.4 マウス HSV-1 皮膚感染モデルでの皮下持続投与における PK/PD 解析

持続投与法を用いて血漿中濃度を一定に保った場合に HSV-1 増殖を完全に抑制する PK パラメータを探索した。

ヘアレスマウス HSV-1 (WT51 株) 皮膚感染モデルにおいて、ウイルス感染 1-2 時間前より ASP2151 溶液 (1, 3, 10, 20 mg/g PEG400) を充填した浸透圧ポンプを皮下に埋設し 5 日間持続投与を行った。感染 5 日後に、血液と病変部位の皮膚を採取し、血漿中 ASP2151 濃度ならびにプラーク法により皮内 HSV-1 ウイルス価を定量した。

感染 5 日後の各投与群における ASP2151 の平均血漿中濃度は投与液の濃度に応じて増加した (Table 5)。血漿中 ASP2151 濃度が 145 ng/mL 以上の全てのマウスで皮内 HSV-1 ウイルス価は検出限界値以下であった (Figure 13)。マウス HSV-1 皮膚感染モデルにおいて感染日から持続投与を開始し血漿中濃度を維持した場合、皮内 HSV-1 ウイルス価を検出限界値以下に抑制するために必要な ASP2151 の血漿中維持濃度は 79–145 ng/mL の範囲に存在すると推測された (Figure 13)。

持続投与において皮内 HSV-1 ウイルス価が検出限界値以下に達した血漿中 ASP2151 濃度 (145 ng/mL) における各 PK マーカーの値は、 C_{\max} 値として 145 ng/mL, AUC_{24h} 値で 3.48 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$, $T_{>100}$ 値で 24 時間と算出された。

Table 5. Plasma concentration of ASP2151 and intradermal HSV-1 titer 5 days after starting subcutaneous infusion to HSV-1-infected mice

Dosing solution (mg/g)	Dose ^a (mg/kg/day)	Mean plasma concentration (ng/mL)	Min–Max concentration (ng/mL)	Mean intradermal HSV-1 titer ^b (log ₁₀ pfu/skin)
Vehicle				5.5
1	1.1	17	9–24	5.3
3	3.3	60	36–79	4.8 *
10	11	235	145–307	2.4 *
20	22	316	28–627	2.6 *

Each group consisted of 10 animals.

^a Dose was calculated from the mean body weight and daily output from the pump.

^b The limit of detection of the intradermal HSV-1 titer was 2.4 log₁₀ pfu/skin.

* Significantly different from the vehicle group at P<0.05 (Dunnett's multiple comparison test)

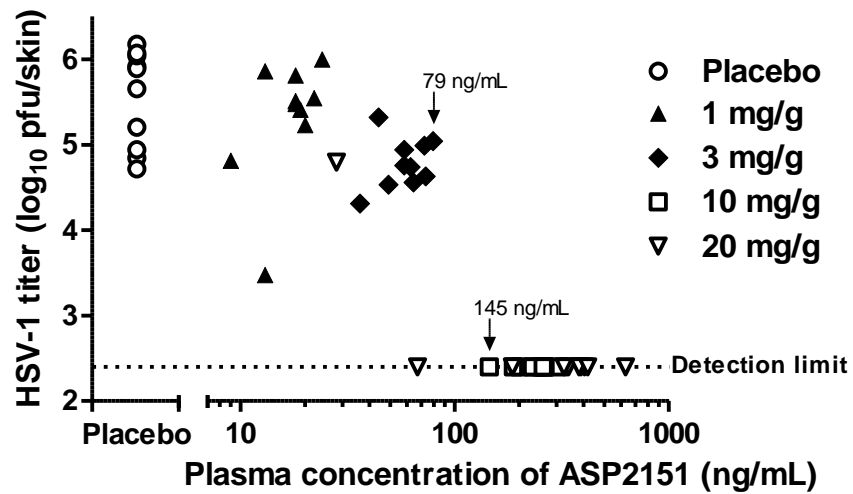


Figure 13. Relationship between intradermal HSV-1 titer and ASP2151 plasma concentration in mice continuously infused with ASP2151. HSV-1-infected mice (10 animals per group) were infused for 5 days with placebo (vehicle) or ASP2151 solution (1, 3, 10, or 20 mg/g dissolved in PEG400) starting 1–2 h before HSV-1 infection. Intradermal HSV-1 titer (log₁₀ pfu/skin) was determined by plaque assay at day 5 post-infection and was then plotted for each animal. Dotted line indicates the lower limit of detection (LOD; 2.40 log₁₀ pfu/skin) for the assay. The highest maintained plasma concentration at which the intradermal HSV-1 titer could be detected and the lowest maintained plasma concentration to reduce the intradermal HSV-1 titer below the detection limit are indicated (79 and 145 ng/mL, respectively).

2.5 HSV-1 増殖を完全に抑制する PK/PD パラメータ

皮内 HSV-1 ウイルス価が検出限界値以下に達するときの C_{\max} 値, AUC_{24h} 値, および $T_{>100}$ 値は, 経口投与の場合はそれぞれ 10000 ng/mL, 60 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$, 21–24 時間であり, 持続投与の場合はそれぞれ 145 ng/mL, 3.48 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$, 24 時間と推測された (Table 6)。これらの PK パラメータを比較したところ, C_{\max} 値, AUC_{24h} 値に比べ $T_{>100}$ 値は投与方法が変わっても大きな違いを示さないことが明らかとなった。

以上の ASP2151 の PK/PD 解析により, HSV-1 皮膚感染モデルにおいて感染日から投与したときに皮内ウイルス増殖を完全に抑制するには, ASP2151 の用法・用量において $T_{>100}$ 値がほぼ 24 時間を満たすこと, 即ち血漿中 ASP2151 濃度がほぼ 100 ng/mL 以上に維持されることが重要と考えられた。

Table 6. Minimum values of C_{\max} , AUC_{24h} , and $T_{>100}$ to reduce the intradermal HSV-1 titer to the below detection limit on oral administration and continuous infusion of ASP2151 in HSV-1-infected mice

Route of ASP2151 treatment	C_{\max} (ng/mL)	AUC_{24h} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	$T_{>100}$ (h)
Oral administration ^a	10000	60	21–24
Continuous infusion ^b	145	3.48 ^c	24

^aThe values for oral administration were estimated from fitted sigmoid curves.

^bFor continuous infusion, the constant plasma ASP2151 concentration of 145 ng/mL, which was the lowest concentration to reduce intradermal HSV-1 titer under the limit of detection, was used to calculate the PK parameter.

^c AUC_{24h} was calculated by multiplying 145 ng/mL by 24 h.

2.6 バラシクロビルの PK/PD 解析

マウス HSV-1 皮膚感染モデルを用いて HSV および VZV 感染症治療薬であるバラシクロビルの薬効に最も相関する PK/PD パラメータを解析した。その結果、性器ヘルペス患者から分離された HSV に対する IC_{50} 値として報告されている $0.01 \mu\text{g/mL}^{73}$ を超える時間 ($T_{>0.01}$) に良く相関していた (Figure 14)。

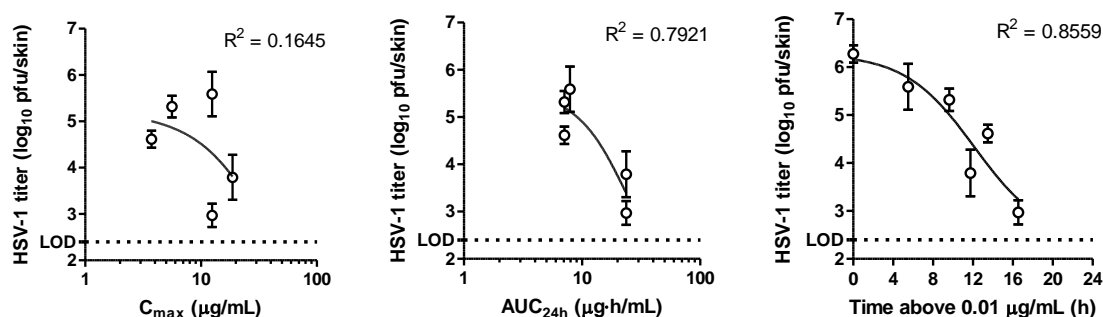


Figure 14. Relationship between intradermal HSV-1 titer and three pharmacokinetic (PK) parameters. The PK parameters C_{max} , AUC_{24h} , and time above $0.01 \mu\text{g/mL}$ were calculated under conditions of valacyclovir-repeated administration either as a single dose or as two or three divided doses (30, 100, or 300 mg/kg/day) in mice. The PK parameters were plotted versus intradermal HSV-1 titer in animals treated with each regimen. Correlations were analyzed using sigmoid- E_{max} model. Data are expressed as mean \pm SE of 3–5 animals. The dotted line and R^2 indicate the lower limit of detection (LOD, $2.40 \log_{10}$ pfu/skin) for the titration assay and the coefficient of determination, respectively.

3 考察

本章では、マウス HSV-1 皮膚感染モデルにおける Dose-fractionation 法ならびに皮下持続投与法の結果から、 $T_{>100}$ 値を 21–24 時間とする用法・用量、即ち 1 日のうち 21–24 時間は血漿中濃度が 100 ng/mL を越える用法・用量で HSV-1 増殖は完全に抑制されることを示した。ヘルペスウイルス感染症治療における抗ヘルペスウイルス剤の効能・効果は、ウイルス増殖を抑え病態の進展を阻止し、その改善を図ることと捉えられるので、ASP2151 の臨床効果は上記の用法・用量において最も優れた効果が得られると推察される。

ASP2151 の臨床効果を予測する上で、HSV および VZV 感染症のスタンダード治療薬であるバラシクロビルと比較することは有用である。マウス HSV-1 皮膚感染モデルを用いてバラシクロビルの薬効に最も関連する PK/PD パラメータを測定した結果、 $T_{>0.01}$ に良く関連していた (Figure 14)。この結果は、性器ヘルペスの再発抑制の観点で調べられたバラシクロビルの臨床 PK/PD 解析結果とほぼ一致した⁷⁴。また、臨床においてバラシクロビルあるいはアシクロビル治療において、薬効を発揮する血漿中アシクロビル濃度の閾値が存在することが示唆されている⁷⁵⁻⁷⁷。これらの報告と今回用いた PD パラメータおよび解析手法に違いはあるものの、ある一定の閾値を超える時間が薬効に関連するという点は、マウス HSV-1 皮膚感染モデルから得られた非臨床 PK/PD 解析結果は、臨床 PK/PD 解析結果と一致している。

帯状疱疹の起因ウイルスである VZV に対する ASP2151 の抗ウイルス活性 EC_{50} 値の平均値は HSV-1 に比べて約 2 倍の高値を示す (Table 4)。また、性器ヘルペスなどの単純疱疹は HSV-1 のみならず HSV-2 も起因ウイルスとなり、HSV-2 に対する ASP2151 の抗ウイルス活性 EC_{50} 値の平均値は HSV-1 に比べて約 2 倍の高値を示す (Table 4)。したがって、HSV-1 感染における $T_{>100}$ 値の指標に対し、VZV および HSV-2 感染においては $T_{>200}$ 値、すなわち血漿中濃度が 200 ng/mL 以上となる 1 日内の時間を指標とすることが妥当と考えられる。

以上の非臨床試験結果に基づき、1 日のうち 21–24 時間は血漿中濃度が 200 ng/mL を超える条件 ($T_{>200}$ 値 = 21–24 時間) を満たす血漿中濃度が得られる用法・用量において、ASP2151 は単純疱疹および帯状疱疹に対し最も優れた臨床効果を示すと推測された。

総括

第一章で ASP2151 は臨床分離 HSV 株に対しアシクロビルに比べ強力な抗ウイルス活性を有し、その活性に株間差および地域差はほとんど見られないことを見出した。また、宿主細胞への影響は少ないこと、さらには、耐性株が出にくいことを示し、ASP2151 が新規抗ヘルペス剤としての有望な特性を有することを確認した。第二章では、HSV 感染動物モデルにおいて、バラシクロビルに比べて強力な抗ウイルス活性を示すとともに、症状発症後の治療的投与の検討においてバラシクロビルに比し優れた皮疹症状改善およびウイルス増殖抑制効果を確認した。また、この症状改善とウイルス増殖抑制が相関することを示し、第一章で示した ASP2151 の強力な抗ウイルス作用を動物モデルにおいても確認した。そこで第三章では ASP2151 の臨床推奨血漿中濃度を推定した。マウス HSV-1 皮膚感染モデルにおける皮内 HSV-1 ウイルス価抑制効果と血漿中濃度の検討を行い、HSV-1 増殖を完全に抑制するには、100 ng/mL の血漿中濃度を 1 日のうち 21–24 時間持続することが必要であることを示した。抗ウイルス剤による臨床効果は、ウイルス増殖の完全な抑制によりその効果が最大に達すると考えられることから、ウイルスの ASP2151 に対する感受性の違いを考慮し、200 ng/mL の血漿中濃度を維持する投与量で HSV および VZV に対する最大の薬効を得ることが出来ると推察した。

HSV-1 および HSV-2 感染を主因とする性器ヘルペス患者および VZV 感染を主因とする帯状疱疹患者での ASP2151 の第 II 相試験では、今回の PK/PD 解析および健常人を対象とした第 I 相反復投与試験結果に基づき、 $T_{>200}$ を満たす用量として 200 mg をターゲットとして設定した。第 II 相試験の結果、ASP2151 の臨床効果は確認され、100, 200, および 400 mg を服用した患者で ASP2151 の薬効はプラトーに達していた。さらに、100–400 mg の ASP2151 を服用したほとんどの患者の血漿中 ASP2151 濃度は 200 ng/mL を超えていた。したがって、今回実施した非臨床 PK/PD 解析により予測した臨床効果は、臨床試験において実証されたものと考えられた。マウス HSV-1 皮膚感染モデルにおける皮内 HSV-1 ウイルス価を指標とした Dose-fractionation 法および持続投与法を用いた試験を組み合わせ実施した PK/PD 解析は抗ヘルペス剤の臨床用量を推定する上で有用であると考えられた。

現在、臨床試験の段階まで到達した候補化合物のうち、最終的に医薬品として承認される確率はわずか8%という、極めて深刻な状況にある。近年の医薬品の開発において、第Ⅱ相臨床試験での成功率が、2006–2007年の28%から2008–2009年には18%に減少したと報告されている⁷⁸。それらの51%は有効性で中止を余儀なくされたと分析されている。こうした背景から、非臨床試験から臨床効果を適切に予測し、新薬の早期開発中止や医薬品開発リスクの軽減を含め開発費を抑制すること、さらには承認までに要する期間の短縮を目指すことは重要である。ウイルスの性状は各ウイルスごとに全く異なるため、抗ウイルス剤の臨床効果予測を行う上で、今回の動物感染モデルを用いたPK/PD解析はHSVあるいはVZVに対する抗ウイルス剤の開発に限定される。しかしながら、抗ウイルス剤は外来病原体が対象となるため、本研究のように臨床分離サンプルを用いた感受性試験、動物感染モデルでの試験ならびにPK/PD理論を用いた臨床効果予測は、抗ウイルス剤開発の基本的なアプローチとして適切と思われる。医学医療の進歩や衛生水準の著しい向上により、多くの感染症が克服されてきたが、まだ満たされていないウイルス感染症は多く残されており、また、新たな感染症の出現や既知の感染症の再興にも備える必要がある。したがって、抗ウイルス剤の開発は今後も求められ、今回の方法論が新規抗ウイルス剤を開発する際に成功例として参照されることを期待する。

実験材料および実験方法

1. 薬剤

ASP2151（分子量 482.55）はアステラス製薬株式会社で合成され，細胞を用いた実験ではジメチルスルホキシドに溶解して 2% FBS 含有 EMEM に添加した。動物実験では，0.5% MC 水溶液に懸濁または 25% Cremophor[®]EL/25% PEG400 水溶液に溶解して経口投与，あるいは 50% PEG400 水溶液に溶解し皮下投与した。

アシクロビルは Sigma-Aldrich 社より購入し，DMSO に溶解して 2% FBS 含有 EMEM に添加した。

バラシクロビルは GlaxoSmithKline 社より購入し，乳鉢で粉碎した後 0.5% MC 水溶液に懸濁し，経口投与した。

2. ウイルス

実験室株（HSV-1 KOS, Miyama； HSV-2 G, Lyon）および本邦臨床分離株（HSV-1 WT-51, H-5, Miyoshi, Fujito, Endo, A4-3； HSV-2 Kondo）は，創薬技術研究所より譲り受けた。米国臨床分離株（HSV-1 CI-25, CI-114, CI-116； HSV-2 CI-27, CI-5243）は，Children's Hospital Medical Center（Cincinnati, OH, USA）の Nancy Sawtell 先生より譲り受けた。

ASP2151 の性器ヘルペス Phase II 臨床試験で分離されたウイルスは，インフォームド・コンセントを得て，2007 年 7 月から 2008 年 8 月までの期間に米国の 26 施設で採取された。

3. 細胞

HEF 細胞および Vero 細胞は創薬技術研究所より譲り受けた。HELF 細胞は共同実験者であるコロラド大学の Weinberg 教授が入手した。細胞は 10% FBS，100 units/mL penicillin G および 100 µg/mL streptomycin 含有 EMEM 培地（増殖培地）で培養し増殖させた。また，感染試験時には FBS 含量を 2% とした培地（維持培地）を使用した。

4. プラーク減少法および細胞毒性アッセイ

HEF 細胞, HELF 細胞, あるいは Vero 細胞を 24-well plate または 48-well plate に播種し, 細胞が単層化するまで培養した。培地を除去し, 約 40–100 pfu/well となるように維持培地で希釈した HSV-1, HSV-2, あるいは VZV を滴下し 37°C で 1 時間培養し感染させた。細胞を培地で 2 回洗った後, 各濃度の薬剤を含む 0.8% MC 含有維持培地を加え, ウイルス感染によるプラークが形成されるまで培養した。細胞は, 10%ホルマリンを添加し固定し, 0.02%クリスタルバイオレット水溶液により染色した。顕微鏡下でプラーク数を測定し, 50%プラーク形成阻害濃度 (EC₅₀) および EC₉₀ 値を sigmoid-E_{max} 非線形回帰分析により測定した。細胞毒性は Vero 細胞を用い, Neutral Red 法により生細胞数を測定し, 50%生細胞数減少濃度 (CC₅₀) を算出した。

5. 耐性ウイルスの定義

HELF 細胞を用いた感受性試験では, それぞれのアッセイごとに感受性株のコントロールをおいた。ACV が 11.1 μM 以上の EC₅₀ 値を示し, かつ感受性コントロール株に対する ACV の EC₅₀ 値の 4 倍以上の EC₅₀ 値を示すウイルス株を ACV 耐性株と定義した。投薬前に存在する ASP2151 耐性については, 感受性コントロール株に対する ASP2151 の EC₅₀ 値の 4 倍以上の EC₅₀ 値を示し, かつ感受性コントロール株の全データから算出された平均値+標準偏差の 3 倍を超える EC₅₀ 値を示すウイルス株を ASP2151 耐性株と定義した。投薬後に出現する ASP2151 耐性については, 同一患者において投薬後のウイルス株に対する ASP2151 の EC₅₀ 値が投薬前のウイルス株に対する EC₅₀ 値の 4 倍以上を示すウイルス株を ASP2151 耐性株と定義した。

6. モルモット HSV-2 膣感染モデル

雌性モルモット（Hartley, 感染時 4 週齢）は、 1.25×10^5 pfu/mL の HSV-2 G 株のウイルス液に浸した綿棒で膣内を塗布して感染させた。膣病変の症状は、その重症度および全身症状で分類し、次の尺度で 0 から 6 にスコア化した。

スコア 0: 変化なし

スコア 1: 膣局所での肉眼で確認できる水疱

スコア 2: 膣の 10%～50%範囲での水疱

スコア 3: 膣の 50%～100%範囲での水疱

スコア 4: 膣の 10%～50%範囲での軽度の潰瘍

スコア 5: 膣の 50%～100%範囲での重度の潰瘍

スコア 6: 麻痺あるいは死亡

スコア-日数曲線下面積（AUC）を算出し、プラセボ群を 100%としたときに 50%抑制させる用量（ED₅₀）を直線回帰により算出した。

膣内分泌 HSV-2 は、維持培地に浸した綿棒でモルモットの膣内を拭った後 1 mL の維持培地に加え回収した。このウイルス含有培地中の HSV-2 ウイルス価をプラーク法で測定した。

7. マウス HSV-1 皮膚感染モデル

雌性ヘアレスマウス（HOS:HR-1, 感染時 7 あるいは 8 週齢）の左後背部の皮膚を注射針で擦過し、 3×10^6 pfu/mL の HSV-1 WT51 株あるいは 6×10^5 pfu/mL の HSV-1 CI-116 株を 15 μ L 滴下し感染させた。皮膚病変の症状は、その重症度および全身症状で分類し、次の尺度で 0 から 7 にスコア化した。

スコア 0: 変化なし

スコア 1: 局所での水疱あるいはただれ

スコア 2: 広範囲の水疱あるいはただれ

スコア 3: 水疱あるいはただれの結合

スコア 4: 帯状の水疱あるいはただれ

スコア 5: 広範囲の潰瘍

スコア 6: 帯状の潰瘍

スコア 7: 麻痺あるいは死亡

皮内 HSV-1 ウイルス価は、マウスの前後肢間の右片側領域の皮膚を採取し、10 mL の生理食塩水中にて均質化し、遠心後の上清中の HSV-1 ウイルス価をプラーク法で測定した。

8. Dose-fractionation 法

マウス HSV-1 皮膚感染モデルを用い、ASP2151 の 1 日あたりの投与量を 3, 10, 30 および 100 mg/kg として、1 日 1 回 (q24h), 1 日 2 回 (q12h), および 1 日 3 回 (q8h) で感染の 2–3 時間後より 5 日間経口投与した。5 日後の皮内 HSV-1 ウイルス価をプラーク法で測定した。

9. 血漿中 ASP2151 濃度測定

マウスに 0.33, 3, 30 および 100 mg/kg の用量で ASP2151 を単回経口投与をした後、0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 および 12 時間後の血漿中の未変化体 ASP2151 濃度を液体クロマトグラフィー質量分析法により測定した。また、30 mg/kg の ASP2151 投与した時の血漿中 ASP2151 濃度を基に、1, 3, 10, 30 および 100 mg/kg/day の ASP2151 を 1 日 1 回, 1 日 2 回あるいは 1 日 3 回で反復投与した時の血漿中濃度推移パターンを nonparametric superposition 法により推定した。

10. Continuous infusion 法

マウス HSV-1 皮膚感染モデルを用い、1, 3, 10 および 20 mg/g in PEG400 の ASP2151 を満たした Alzet 浸透圧ポンプ (model 2001) を感染の 1–2 時間前に皮下に埋設した。ポンプの溶出速度は 23.28 μ L/day であり、平均マウス体重は 20.4 g であったため、1, 3, 10 および 20 mg/g の ASP2151 で皮下投与された 1 日あたりの用量は、それぞれ約 1.1, 3.3, 11 および 22 mg/kg と算出された。HSV-1 感染 5 日後の皮内 HSV-1 ウイルス価をプラーク法により、血漿中 ASP2151 濃度を液体クロマトグラフィー質量分析法により測定した。

11. PK/PD 解析

PK パラメータとして、 C_{\max} 、 AUC_{24h} および $T_{>100}$ を用い、皮内平均 HSV-1 ウイルス価に対してプロットし医療統計解析ソフトウェア GraphPad Prism の sigmoid dose-response (variable slope) プログラムで非線形回帰した。

$$y = \text{bottom} + (\text{top} - \text{bottom}) / (1 + 10^{[(\log EC50 - x) \times \text{Hill Slope}]})$$

x はそれぞれの PK パラメータの log 値, y は皮内 HSV-1 ウイルス価 (\log_{10} pfu/skin), top は vehicle 群の平均値 (\log_{10} pfu/skin), bottom は \log_{10} 250 値 (検出限界値) とした。

12. 統計解析

プラーク減少法では、ASP2151 とアシクロビルの EC_{50} 値の差および抗ウイルス剤の患者への投与前後の差を Student の t 検定により解析した。

モルモット HSV-2 膣感染モデルを用いた予防投与試験は、プラセボ投与群と各薬剤投与群の AUC の差を Dunnett の多重比較検定により解析した。発症後投与試験では、両薬剤の作用発現の時間的な推移を検討するために、プラセボ投与群のスコアと各薬剤投与群との比較は、反復測定二元配置分散分析を用いて解析し、有意な交互作用があった場合、各観察日の投与群間の差を Dunnett の多重比較検定により解析した。また、プラセボ群と各薬剤投与群の AUC の差を Dunnett の多重比較検定により解析し、両薬剤の薬効強度の比較を行うことを目的に、総ての群での AUC の対比較を Turkey 検定により解析した。膣内 HSV-2 ウイルス価はプラセボ群と薬剤投与群の差を Steel 検定で解析した。

何れの解析も危険率 5% 未満を有意と判定した。

謝辞

本学位論文の作成に際し、御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野 平澤典保教授に謹んで感謝申し上げます。また、本学位論文の御校閲を賜りました東北大学大学院薬学研究科がん化学療法薬学分野 富岡佳久教授、並びに薬物動態学分野 吉成浩一准教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、御指導、御助言を賜りましたアステラス製薬株式会社 鈴木弘博士並びに高倉昭治博士に心から御礼申し上げます。本研究に際し、御協力頂きましたアステラス製薬株式会社 長野浩治博士をはじめとする研究本部の皆様に深く感謝申し上げます。

引用文献

1. Pellet, P.E. & Roizman, B. The family Herpesviridae: a brief introduction. In: Fields Virology—Knipe D, Howley PM, Griffin DE, et al, eds. *Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins*, 2479–2499 (2007).
2. Stanberry, L., *et al.* New developments in the epidemiology, natural history and management of genital herpes. *Antiviral Res* **42**, 1-14 (1999).
3. Snoeck, R. & De Clercq, E. New treatments for genital herpes. *Curr Opin Infect Dis* **15**, 49-55 (2002).
4. Benedetti, J., Corey, L. & Ashley, R. Recurrence rates in genital herpes after symptomatic first-episode infection. *Ann Intern Med* **121**, 847-854 (1994).
5. Kinghorn, G.R. Epidemiology of genital herpes. *J Int Med Res* **22 Suppl 1**, 14A-23A (1994).
6. Ashley, R.L. & Wald, A. Genital herpes: review of the epidemic and potential use of type-specific serology. *Clin Microbiol Rev* **12**, 1-8 (1999).
7. Lafferty, W.E. The changing epidemiology of HSV-1 and HSV-2 and implications for serological testing. *Herpes* **9**, 51-55 (2002).
8. Wald, A., Zeh, J., Selke, S., Ashley, R.L. & Corey, L. Virologic characteristics of subclinical and symptomatic genital herpes infections. *N Engl J Med* **333**, 770-775 (1995).
9. Whitley, R.J., Kimberlin, D.W. & Roizman, B. Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis* **26**, 541-553; quiz 554-545 (1998).
10. Whitley, R.J. & Roizman, B. Herpes simplex virus infections. *Lancet* **357**, 1513-1518 (2001).
11. 森島恒雄 & 庄司紘史. 新生児ヘルペス, 単純ヘルペス脳炎. ヘルペスウイルス感染症 監修・編集 新村真人, 山西弘一. 発行・臨床医薬研究協会, 144-151 (1996).
12. Keet, I., *et al.* Herpes simplex virus type 2 and other genital ulcerative infections as a risk factor for HIV-1 acquisition. *Genitourinary medicine* **66**, 330-333 (1990).

13. Smith, J.S. & Robinson, N.J. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. *The Journal of infectious diseases* **186 Suppl 1**, S3-28 (2002).
14. Arvin, A.M. Varicella-zoster virus. *Clin Microbiol Rev* **9**, 361-381 (1996).
15. Donahue, J.G., Choo, P.W., Manson, J.E. & Platt, R. The incidence of herpes zoster. *Arch Intern Med* **155**, 1605-1609 (1995).
16. Dworkin, R.H., Perkins, F.M. & Nagasako, E.M. Prospects for the prevention of postherpetic neuralgia in herpes zoster patients. *Clin J Pain* **16**, S90-100 (2000).
17. Johnson, R.W. & Johnson, R.W. Herpes zoster in the immunocompetent patient: management of post-herpetic neuralgia. *Herpes* **10**, 38-45 (2003).
18. Kost, R.G. & Straus, S.E. Postherpetic neuralgia--pathogenesis, treatment, and prevention.[see comment]. *New England Journal of Medicine* **335**, 32-42 (1996).
19. Wassilew, S.W., Wutzler, P. & Brivddin Herpes Zoster Study, G. Oral brivudin in comparison with acyclovir for herpes zoster: a survey study on postherpetic neuralgia. *Antiviral Res* **59**, 57-60 (2003).
20. Wassilew, S.W. & Wutzler, P. Oral brivudin in comparison with acyclovir for improved therapy of herpes zoster in immunocompetent patients: results of a randomized, double-blind, multicentered study. *Antiviral Res* **59**, 49-56 (2003).
21. Yawata, M. Deaths Due to Drug-Interaction. *Lancet* **342**, 1166-1166 (1993).
22. Villarreal, E.C. Current and potential therapies for the treatment of herpes-virus infections. *Prog Drug Res* **60**, 263-307 (2003).
23. Coen, D.M. & Schaffer, P.A. Antiherpesvirus drugs: a promising spectrum of new drugs and drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 278-288 (2003).
24. Crute, J.J., *et al.* Herpes simplex virus helicase-primase inhibitors are active in animal models of human disease. *Nat Med* **8**, 386-391 (2002).
25. Kleymann, G., *et al.* New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease. *Nat Med* **8**, 392-398 (2002).
26. Chono, K., *et al.* ASP2151, a novel helicase-primase inhibitor, possesses antiviral activity against varicella-zoster virus and herpes simplex virus types 1 and 2. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **65**, 1733-1741 (2010).

27. Hasegawa, T., *et al.* Susceptibility to acyclovir of herpes simplex virus isolates obtained between 1977 and 1996 in Japan. *J Med Virol* **63**, 57-63 (2001).
28. Honda, M., *et al.* Effect of long-term, low-dose acyclovir suppressive therapy on susceptibility to acyclovir and frequency of acyclovir resistance of herpes simplex virus type 2. *Antivir Chem Chemother* **12**, 233-239 (2001).
29. Okuda, T., *et al.* Suppression of generation and replication of acyclovir-resistant herpes simplex virus by a sensitive virus. *J Med Virol* **72**, 112-120 (2004).
30. Piret, J. & Boivin, G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 459-472 (2011).
31. Ida, M., *et al.* Characterization of acyclovir susceptibility and genetic stability of varicella-zoster viruses isolated during acyclovir therapy. *J Dermatol Sci* **23**, 63-72 (2000).
32. Parris, D.S. & Harrington, J.E. Herpes simplex virus variants resistant to high concentrations of acyclovir exist in clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **22**, 71-77 (1982).
33. Bacon, T.H., Levin, M.J., Leary, J.J., Sarisky, R.T. & Sutton, D. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev* **16**, 114-128 (2003).
34. Collins, P. & Darby, G. Laboratory studies of herpes simplex virus strains resistant to acyclovir. *Reviews in Medical Virology* **1**, 19-28 (1991).
35. Shin, Y.K., Cai, G.Y., Weinberg, A., Leary, J.J. & Levin, M.J. Frequency of acyclovir-resistant herpes simplex virus in clinical specimens and laboratory isolates. *J Clin Microbiol* **39**, 913-917 (2001).
36. Morfin, F. & Thouvenot, D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J Clin Virol* **26**, 29-37 (2003).
37. Safrin, S., *et al.* Correlation between response to acyclovir and foscarnet therapy and in vitro susceptibility result for isolates of herpes simplex virus from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 1246-1250 (1994).

38. Levin, M.J., Bacon, T.H. & Leary, J.J. Resistance of Herpes Simplex Virus Infections to Nucleoside Analogues in HIV-Infected Patients. *Clin Infect Dis* **39**, S248-S257 (2004).
39. Nyquist, A.C., *et al.* Acyclovir-resistant neonatal herpes simplex virus infection of the larynx. *J Pediatr* **124**, 967-971 (1994).
40. Oram, R.J., *et al.* Characterization of an acyclovir-resistant herpes simplex virus type 2 strain isolated from a premature neonate. *The Journal of infectious diseases* **181**, 1458-1461 (2000).
41. Levin, M.J., Weinberg, A., Leary, J.J. & Sarisky, R.T. Development of acyclovir-resistant herpes simplex virus early during the treatment of herpes neonatorum. *Pediatr Infect Dis J* **20**, 1094-1097 (2001).
42. Chono, K., Katsumata, K., Kontani, T., Shiraki, K. & Suzuki, H. Characterization of virus strains resistant to the herpes virus helicase-primase inhibitor ASP2151 (Amenamevir). *Biochem Pharmacol* **84**, 459-467 (2012).
43. Richards, D.M., *et al.* Acyclovir. A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* **26**, 378-438 (1983).
44. Christophers, J., *et al.* Survey of resistance of herpes simplex virus to acyclovir in northwest England. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 868-872 (1998).
45. Field, H.J. Herpes simplex virus antiviral drug resistance--current trends and future prospects. *J Clin Virol* **21**, 261-269 (2001).
46. Biswas, S., Smith, C. & Field, H.J. Detection of HSV-1 variants highly resistant to the helicase-primase inhibitor BAY 57-1293 at high frequency in 2 of 10 recent clinical isolates of HSV-1. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **60**, 274-279 (2007).
47. Sukla, S., *et al.* Mismatch primer-based PCR reveals that helicase-primase inhibitor resistance mutations pre-exist in herpes simplex virus type 1 clinical isolates and are not induced during incubation with the inhibitor. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **65**, 1347-1352 (2010).
48. Huang, M., *et al.* No emergence of resistance under treatment with the novel HSV inhibitor AIC316 in persons with genital herpes. The 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) in USA, Chicago, 17 - 20

September, 2011 (Session 2112, 2018th September 2011 at 2011:2015 am, Presentation V-2941b) (2011).

49. Lucas, B.A., Wiesendanger, W. & Schmidt-Ruppin, K.H. Genital herpes in guinea pigs. *Archives of Virology* **44**, 153-155 (1974).
50. Whitley, R.J. Herpes simplex viruses. In *Fields Virology 5th ed. Edited by DM Knipe & PM Howley. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.* (2006).
51. Landry, M.L., Myerson, D. & Bull, C. Recurrent genital infection in the guinea pig: differences between herpes simplex types 1 and 2. *Intervirology* **34**, 169-179 (1992).
52. Stanberry, L.R. Animal-Models and HSV Latency. *Semin Virol* **5**, 213-219 (1994).
53. Stanberry, L.R., Kern, E.R., Richards, J.T., Abbott, T.M. & Overall, J.C., Jr. Genital herpes in guinea pigs: pathogenesis of the primary infection and description of recurrent disease. *The Journal of infectious diseases* **146**, 397-404 (1982).
54. Stanberry, L.R., Kit, S. & Myers, M.G. Thymidine kinase-deficient herpes simplex virus type 2 genital infection in guinea pigs. *J Virol* **55**, 322-328 (1985).
55. Stanberry, L.R., Kern, E.R., Richards, J.T. & Overall, J.C., Jr. Recurrent genital herpes simplex virus infection in guinea pigs. *Intervirology* **24**, 226-231 (1985).
56. Machida, H., Ijichi, K. & Takezawa, J. Efficacy of oral treatment with BV-araU against cutaneous infection with herpes simplex type 1 in shaved mice. *Antiviral Res* **17**, 133-143 (1992).
57. Himaki, T., *et al.* Efficacy of ASP2151, a helicase-primase inhibitor, against thymidine kinase-deficient herpes simplex virus type 2 infection in vitro and in vivo. *Antiviral Res* **93**, 301-304 (2012).
58. Sasaki, S.I., *et al.* Efficacy of herpes virus helicase-primase inhibitor, ASP2151, for treating herpes simplex keratitis in mouse model. *British Journal of Ophthalmology* (2013).
59. Reichman, R.C., *et al.* Treatment of Recurrent Genital Herpes Simplex Infections With Oral Acyclovir: A Controlled Trial. *JAMA* **251**, 2103-2107 (1984).
60. Spruance, S.L., *et al.* Treatment of recurrent herpes simplex labialis with oral acyclovir. *The Journal of infectious diseases* **161**, 185-190 (1990).
61. Landry, M.L., *et al.* Effect of acyclovir on genital infection with herpes simplex virus types 1 and 2 in the guinea pig. *Am J Med* **73**, 143-150 (1982).

62. Pronovost, A.D., Lucia, H.L., Dann, P.R. & Hsiung, G.D. Effect of acyclovir on genital herpes in guinea pigs. *The Journal of infectious diseases* **145**, 904-908 (1982).
63. Myerson, D. & Hsiung, G.D. Prophylactic and therapeutic treatment with acyclovir of genital herpes in the guinea pig. *Proc Soc Exp Biol Med* **174**, 147-152 (1983).
64. Wald, A., *et al.* Frequent genital herpes simplex virus 2 shedding in immunocompetent women. Effect of acyclovir treatment. *J Clin Invest* **99**, 1092-1097 (1997).
65. Gupta, R., *et al.* Valacyclovir and acyclovir for suppression of shedding of herpes simplex virus in the genital tract. *The Journal of infectious diseases* **190**, 1374-1381 (2004).
66. Baumeister, J., *et al.* Superior efficacy of helicase-primase inhibitor BAY 57-1293 for herpes infection and latency in the guinea pig model of human genital herpes disease. *Antivir Chem Chemother* **18**, 35-48 (2007).
67. Kern, E.R. Acyclovir treatment of experimental genital herpes simplex virus infections. *The American Journal of Medicine* **73**, 100-108 (1982).
68. Bilello, J.A., Bauer, G., Dudley, M.N., Cole, G.A. & Drusano, G.L. Effect of 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine in an in vitro hollow-fiber pharmacodynamic model system correlates with results of dose-ranging clinical studies. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 1386-1391 (1994).
69. Jumbe, N., *et al.* Application of a mathematical model to prevent in vivo amplification of antibiotic-resistant bacterial populations during therapy. *J Clin Invest* **112**, 275-285 (2003).
70. Louie, A., *et al.* Pharmacodynamics of daptomycin in a murine thigh model of *Staphylococcus aureus* infection. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 845-851 (2001).
71. Preston, S.L., *et al.* In vitro-in vivo model for evaluating the antiviral activity of amprenavir in combination with ritonavir administered at 600 and 100 milligrams, respectively, every 12 hours. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3393-3399 (2003).
72. Drusano, G.L., *et al.* Hollow-fiber unit evaluation of a new human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor, BMS-232632, for determination of the linked pharmacodynamic variable. *The Journal of infectious diseases* **183**, 1126-1129 (2001).

73. McLaren, C., Corey, L., Dekket, C. & Barry, D.W. In vitro sensitivity to acyclovir in genital herpes simplex viruses from acyclovir-treated patients. *The Journal of infectious diseases* **148**, 868-875 (1983).
74. Patel, R. & Bell, A.R. Valaciclovir for the suppression of recurrent genital herpes: relationship between efficacy and pharmacokinetic parameters. *Antiinfect Drugs Chemother* **16**, 19 (1998).
75. Saiag, P., Praindhui, D. & Chastang, C. A double-blind, randomized study assessing the equivalence of valacyclovir 1000 mg once daily versus 500 mg twice daily in the episodic treatment of recurrent genital herpes. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**, 525-531 (1999).
76. Spruance, S.L., Tyring, S.K., DeGregorio, B., Miller, C. & Beutner, K. A Large-Scale, Placebo-Controlled, Dose-Ranging Trial of Peroral Valaciclovir for Episodic Treatment of Recurrent Herpes Genitalis. *Arch Intern Med* **156**, 1729-1735 (1996).
77. Tod, M., *et al.* Pharmacokinetics of oral acyclovir in neonates and in infants: a population analysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 150-157 (2001).
78. Arrowsmith, J. Trial watch: Phase II failures: 2008-2010. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 328-329 (2011).